

New nucleic acid encoding moth allergens, related polypeptides and antibodies, useful in the diagnosis and treatment of arthropod allergies

Publication number: DE10041541 (A1)

Publication date: 2002-03-14

Inventor(s): DUCHENE MICHAEL [AT]; BINDER MARINA [AT]; MAHLER VERA [DE]; HAYEK BRIGITTE [AT]; PROZELL SABINE [DE]; SCHOELLER MATTHIAS [DE] *

Applicant(s): DUCHENE MICHAEL [AT] *

Classification:





- **international:** **A61P37/08; C07K14/435; C12N15/12; C12N15/13; A61K39/00; A61P37/00; C07K14/435; C12N15/12; C12N15/13; A61K39/00; (IPC1-7): A61K38/17; C07H21/00; C07K14/435; C07K16/00; C12N15/13; C12N15/63**

- **European:** C07K14/435A; C07K14/435A4

Application number: DE20001041541 20000824

Priority number(s): DE20001041541 20000824

Also published as:

 EP1191100 (A2)
 EP1191100 (A3)
 EP1191100 (B1)
 AT461280 (T)

Abstract of DE 10041541 (A1)

A nucleic acid (I) encoding an allergenic polypeptide (II), is new. A nucleic acid (I) encoding an allergenic polypeptide (II) comprises: (a) a sequence (1; 1294 bp), (3; 1092 bp), (5; 2230 bp) or (7; 1076 bp), fully defined in the specification, or their fragments that encode an allergenic determinant; (b) an equivalent of (a) within the degeneracy of the genetic code; (c) a sequence with over 80% identity with (a) or (b) above; or (d) a sequence that hybridizes to (a)-(c) above under stringent conditions. Independent claims are also included for the following: (1) nucleic acid (Ia) that encodes a protein (2; 355 amino acids (aa)), (4; 285 aa), (6; 705 aa) or (8; 254 aa), fully defined in the specification; (2) recombinant nucleic acid (Ib) that (i) encodes a polypeptide having the antigenicity of (2), (4), (6) or (8), and derived from arthropods or (ii) hybridizes to (i) under stringent conditions; (3) vector containing (I)-(Ib), linked to expression control elements; (4) cell transformed with (I)-(Ib) or the vector of (c); (5) (II) or polypeptides (IIa) immunologically cross-reactive with them; (6) antibodies (Ab) against (II) or (IIa); (7) pharmaceutical composition containing any of (I)-(Ib), the vector of (c) or cell of (d), (II), (IIa) or Ab; (8) method for diagnosing allergy to arthropods; and (9) an allergen that is an arginine kinase.

.....
 Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 100 41 541 A 1**

51 Int. Cl.7:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
C 07 H 21/00
C 12 N 15/63
C 12 N 15/13

21 Aktenzeichen: 100 41 541.5
22 Anmeldetag: 24. 8. 2000
43 Offenlegungstag: 14. 3. 2002

DE 100 41 541 A 1

71 Anmelder:
Duchene, Michael, Dr., Wien, AT

74 Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

72 Erfinder:
Duchêne, Michael, Dr., Wien, AT; Binder, Marina,
Wien, AT; Mahler, Vera, 91054 Erlangen, DE; Hayek,
Brigitte, Wien, AT; Prozell, Sabine, 10407 Berlin, DE;
Schölller, Matthias, 10247 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Rekombinante Allergene aus der Motte *Plodia interpunctella*
- 57 Die Erfindung betrifft rekombinante Allergene p40 (Argininkinase), p33 (Tropomyosin), p84 (Arylphorin) und p27 (eine Oxidoreduktase) aus der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella*, deren Fragmente und abgeleitete rekombinante DNA-Moleküle, Vektoren und Wirtszellen, die diese rekombinanten DNA-Moleküle enthalten, sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen der beschriebenen Allergene und Fragmente.

DE 100 41 541 A 1

[0001] Die vorgestellte Erfindung befaßt sich insbesondere mit dem Problem der allergischen Reaktion auf Invertebratenproteine am Beispiel der Allergie gegen Proteine aus der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella*. Sie beschreibt rekombinante Moleküle, die von vier Allergenen dieser Spezies abgeleitet sind und ihre Anwendung für Diagnose und Therapie von Allergien und die Detektion von Allergenen in der Umwelt des Menschen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Bis zu 20% der Bevölkerung der Industriestaaten leiden unter Typ I allergischen Symptomen (Rhinitis, Konjunktivitis, bronchialem Asthma) (Myamoto et al., 1992). Bei der Typ I Allergie bindet das Allergen an IgE-Antikörper auf der Oberfläche von Mastzellen. Das IgE ist an die hochaffinen Fc_εRI-Rezeptoren gebunden, die durch die zusätzliche Bindung der Allergene quervernetzt werden und damit der Mastzelle signalisieren, biologische Mediatoren wie zum Beispiel Histamin freizusetzen (Segal et al., 1977). In den vergangenen Jahren ist gezeigt worden, daß Allergene meist wasserlösliche Proteine sind, die in vielen Fällen in rekombinanter Form erzeugt werden können (Kraft et al., 1999). Noch vor wenigen Jahren wurde ausschließlich speziesspezifische Allergiediagnostik betrieben, bei der Gesamtextrakte natürlicher Allergenquellen, z. B. von Pollen oder Tierhaarextrakte als Antigen eingesetzt wurden. Diese Extrakte sind biochemisch nicht genau definiert, manchmal fehlen wichtige allergene Komponenten. Deshalb wird in den vergangenen Jahren in zunehmender Weise eine komponentenspezifische Diagnose (CRD, "component resolved diagnosis") mit Hilfe von gut definierten, rekombinanten Allergenen eingeführt (Valenta et al., 1999).

[0003] Während die Allergene außerhalb des Hauses meist mit Pflanzenpollen assoziiert sind, kommen im Haus mehr Allergene aus Tieren vor, sowohl von Schädlingen als auch von Haustieren. Bei den Schädlingen steht als Allergenquelle die Hausstaubmilbe, ein Spinnentier (Thomas und Smith, 1999) an erster Stelle. Besonders in den USA ist die Küchenschabe, ein flügelloses Insekt, auch als Allergenquelle wichtig (Rosenstreich et al., 1997; von Wijnen et al., 1997). Von beiden sind eine Reihe rekombinanter Allergene bekannt (Arruda et al., 1995; Thomas und Smith, 1999). Eine zusätzliche Allergenquelle im Haus sind Schimmelpilze, von denen in den letzten Jahren ebenfalls mehrere allergene Komponenten charakterisiert und für die Diagnostik eingesetzt wurden (Unger et al., 1999).

[0004] Diese Erfindung befaßt sich mit einer bisher kaum untersuchten Allergenquelle im häuslichen Bereich, den Motten. Bei den Motten handelt es sich um Insekten, um echte Schmetterlinge (Lepidoptera). Die Hauptvertreter sind *Plodia interpunctella*, die Dörrobstmotte, im englischen Sprachgebrauch "Indian meal moth" und *Tineola bisselliella*, die Kleidermotte, "webbing clothes moth". Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf *P. interpunctella*, allerdings sind die verschiedenen Mottenarten nah verwandt und deshalb ist zu erwarten, daß die Allergene der verschiedenen Mottenarten immunologisch kreuzreaktiv sind. Die Dörrobstmotte ist ein Nahrungsmittelparasit, sie wird hauptsächlich in der Küche gefunden und befällt trockene Nahrungsmittel wie Nüsse, Dörrobst, Schokolade, Hafer, Maismehl, Müesli. Es wird vermutet, daß die Dörrobstmotte aus Südamerika stammt. Sie ist der häufigste Nahrungsmittelschädling in den amerikanischen Haushalten und wurde deshalb im Mai 1999 vom Department of Environmental Health & Safety der Harvard Universität zum "Schädling des Monats" gewählt (http://www.uos.harvard.edu/ehs/hot_topics/pom_meal_moth.html). Auch in den deutschen Haushalten ist die Dörrobstmotte häufig (zum Beispiel: Vorratsschädling Nr. 1: die Dörrobstmotte. Sendung im Westdeutschen Rundfunk am 9. Mai 1997, von Michael Wiegert-Wegener). Abgestorbene Motten trocknen aus und landen typischerweise über den Hausstaub im Staubsauger. Dieser stößt große Mengen von winzigen Staubpartikeln aus, die auch Proteine der eingesaugten Insekten und damit potentielle Allergene enthalten.

[0005] Bisher ist noch von keinem Allergen aus irgendeiner Mottenspezies die Struktur aufgeklärt worden. Außerdem gibt es noch keine Publikation in der gesamten medizinischen Literatur (Medline), die sich mit der Dörrobstmotte im Zusammenhang mit Allergie beschäftigt. Dennoch gibt es eine kleine Zahl von Publikationen, die sich mit Allergien gegen andere Motten beschäftigen. Die Studie von Baldo und Panzani (1988) charakterisiert Extrakte verschiedener Insektenspezies, darunter auch der Kleidermotte (*Tineola bisselliella*) mit IgE Immunoblots, enthält jedoch keine Primärstrukturen. Mehrere Publikationen berichten über allergische Reaktionen gegen Motten oder Seidenraupen bei beruflicher Exposition, zum Beispiel mit Seidenraupen (Komase et al. 1997, Suzuki et al., 1995, Wang et al., 1994), verschiedenen Schmetterlingen (Davis and Jenkins 1995), oder Mehlmoten (Storms et al., 1981).

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt vier rekombinante Allergene aus der wichtigsten Nahrungsmittelmotte für verschiedene medizinisch-diagnostische, umweltanalytische und therapeutische Zwecke zur Verfügung.

[0007] Homologe der vier beschriebenen Allergene sind in verschiedenen Spezies in der Vergangenheit bereits untersucht worden, es handelt sich um Argininkinasen, Tropomyosine, Arylphorine und eine Familie von Oxidoreduktasen. Tropomyosine sind als Allergene gut beschrieben (Reese et al., 1999) und auch zum Arylphorin als Allergen bei Schaben (*Periplaneta americana*) gibt es eine Publikation (Wu et al., 1996). In der Literatur sind auch schon einige Redox-Enzyme als Allergen beschrieben, hauptsächlich bei Pilzen und Pflanzen. Das Protein, das zu der gefundenen Oxidoreduktase aus der Motte am nächsten verwandt ist, ist die bakterielle Glukose-1-Dehydrogenase (Nagao et al., 1992), welche selbst nicht als Allergen bekannt ist. Die Argininkinase ist hingegen noch nicht als Allergen identifiziert worden, auch wenn in einer Publikation über ein Allergen Par f 1 aus der Garnele *Parapenaeus fissurus* Peptidsequenzen veröffentlicht wurden, die Sequenzähnlichkeiten zu Argininkinasen anderer Spezies aufweisen (Lin et al., 1993). Diese Ähnlichkeiten wurden jedoch in der Veröffentlichung nicht beschrieben. Die Argininkinase ist ein Enzym, das in Muskeln von Invertebraten Argininphosphat als Energie-Reservestoff bildet (Wyss et al., 1995). Auch bei Insekten wurde die Argininkinase in ihrer Primärstruktur aufgeklärt (Kucharski und Maleszka, 1998), allerdings nie als Allergen beschrieben.

[0008] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, daß die Dörrobstmotte, die in unseren Wohnungen sehr häufig als Nahrungsmittelschädling auftritt, auch eine Allergenquelle darstellen kann. Etwa die Hälfte der untersuchten Patientenseren wiesen IgE gegen Mottenallergene auf. Die Erfindung stellt molekular genau definierte Reagenzien zur Verfügung, die von den beschriebenen Allergenen p40 (Argininkinase), p33 (Tropomyosin), p84 (Arylphorin) und p27 (Oxidoreduktase) abgeleitet sind und einerseits eine exakt definierte und einfache in vitro und in vivo Diagnose und The-

rapie der Allergie gegen Motten ermöglichen, andererseits den Nachweis von Mottenproteinen in Proben aus Haushalt, Schule oder Betrieb. Die Bezeichnungen der Allergene erfolgen in Anlehnung an ihre Molekulargewichte in kDa.

[0009] Das Allergen p40 ist überdies ein neues Panallergen von wirbellosen Tieren, das auch in der Hausstaubmilbe, in der Schabe und in Meeresfrüchten gefunden wird und in diesen Spezies immunologisch verwandt mit p40 aus der Motte ist. So ist es denkbar, daß man sich durch den Kontakt mit Motten oder Milben sensibilisiert und in der Folge eine Nahrungsmittelallergie gegen Meeresfrüchte entwickelt. Für die Untersuchung einer solchen Kreuzsensibilisierung können das rekombinante p40 oder nahe verwandte Moleküle eingesetzt werden.

Beschreibung der Erfindung

[0010] Die Erfindung betrifft eine Nucleinsäure, kodierend für ein allergenes Polypeptid, umfassend

- (a) eine der in SEQ ID No. 1, 3, 5 oder 7 dargestellten Sequenzen oder ein Fragment davon, welches für eine allergene Determinante davon kodiert.
 - (b) eine von einer Sequenz gemäß (a) auf Grund einer Degeneration des genetischen Codes abweichende Sequenz,
 - (c) eine Sequenz mit einer Identität > 80% zu einer der Sequenzen unter (a) und/oder (b) oder
 - (d) eine Sequenz, die mit einer der Sequenzen gemäß (a), (b) und/oder (c) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- sowie eine Nucleinsäure, umfassend einen Bereich, der für ein Polypeptid mit einer in SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 dargestellten Sequenz kodiert.

[0011] Ein erster Aspekt der Erfindung sind rekombinante DNA-Moleküle, die Nucleotidsequenzen (I) aufweisen, die Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene p40, p33, p84 oder p27 besitzen und aus Arthropoden isoliert sind, oder Nucleotidsequenzen (II), die mit solchen Nucleotidsequenzen (I) unter hochstringenten Bedingungen hybridisieren. Die rekombinanten DNA-Moleküle umfassen auch degenerierte Varianten dieser Nucleotidsequenzen.

[0012] Die rekombinanten DNA-Moleküle können auch Nucleotidsequenzen enthalten, die für Polypeptide kodieren, die antigene Kreuzreaktivität und einen hohen Grad von Identität (vorzugsweise > 50%, insbesondere > 60 % oder > 75%) mit den Allergenen p40 p33, p84 und p27 aus Arthropoden besitzen, die in der **Abb. 3–6** angegeben sind. Die Bezeichnungen p40, p33, p84 und p27 beziehen sich auf die Molekulargewichte der Polypeptide in kDa.

[0013] Der Ausdruck "Hybridisierung unter hochstringenten Bedingungen" gemäß der vorliegenden Erfindung wird wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 1.101–1.104) verwendet. Bevorzugt liegt eine hochstringente Hybridisierung gemäß der vorliegenden Erfindung vor, wenn nach Waschen für 1 Stunde mit $1 \times \text{SSC}$ und 0,1% SDS bei 50°C, bevorzugt bei 55°C, mehr bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, und mehr bevorzugt für 1 Stunde bei $0,2 \times \text{SSC}$ und 0,1% SDS bei 50°C, bevorzugt bei 55°C, mehr bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet werden kann.

[0014] Der Ausdruck "Identität", wie hierin verwendet, kann durch die Gleichung $I(\%) = [1 - V/X] \times 100$ definiert werden, worin I die Identität in % ausgedrückt bedeutet, X die Gesamtzahl der Nucleobasen einer Nucleotidsequenz für p40, p33, p27 oder p84 ist und V die Anzahl an davon abweichenden Nucleobasen der zu vergleichenden Sequenzen ist.

[0015] Ein zweiter Aspekt der Erfindung sind rekombinante Expressionsvektoren oder rekombinante Klonierungssysteme, die eine Expressionskontrollsequenz aufweisen, die operativ mit einem der oben beschriebenen Moleküle verknüpft ist.

[0016] Ein dritter Aspekt der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Molekül oder einem Vektor nach dem ersten oder zweiten Aspekt der Erfindung transformiert ist.

[0017] Ein vierter Aspekt der Erfindung ist ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, das antigene Epitope der p40, p33, p84 oder p27 Moleküle besitzt, die in den Aminosäuresequenzen von **Abb. 3–6** enthalten sind. Das Protein oder Polypeptid kann dabei mit einem weiteren heterologen Polypeptid wie einer zellulosebindenden Domäne, β -Galaktosidase oder Glutathion-S-Transferase oder irgendeinem anderen Polypeptid fusioniert sein, das in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen exprimiert werden kann. Das Protein oder Polypeptid, das mit p40, p33, p84 oder p27 kreuzreaktiv ist, kann dabei mit analytisch nachweisbaren Gruppen oder mit wasserlöslichen oder wasserunlöslichen Phasen konjugiert sein, die für die Durchführung des Nachweises von Antikörpern wie zum Beispiel IgA, IgD, IgE, IgG oder IgM geeignet sind. In den Aspekten der Erfindung, die sich mit in vitro Diagnostik befassen (siehe unten), können die Peptide der Erfindung a) an eine wasserunlösliche Phase durch physikalische Adsorption oder eine kovalente Bindung gekoppelt sein oder b) kovalent an eine analytisch nachweisbare Gruppe (Markierung) gekoppelt sein.

[0018] Die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Fragmente davon, welche antigene Determinanten enthalten, können als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Zur Herstellung von für die allergenen Determinanten spezifischen Antikörpern können Standardprotokolle herangezogen werden. Die Antikörper können dann z. B. zum Nachweis von Allergenen und/oder zur Therapie verwendet werden.

[0019] Die Erfindung umfaßt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nucleinsäure, einen Vektor, eine Zelle, ein Polypeptid oder einen Antikörper, wie hierin definiert, als Wirkstoff. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe sowie ggf. weitere Wirkstoffe enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann für diagnostische oder/und therapeutische Zwecke verwendet werden, insbesondere für Therapie oder/und Diagnose von allergischen Erkrankungen.

[0020] Der fünfte Aspekt der Erfindung ist eine in vitro Methode der Diagnose von Allergie gegen Arthropodenproteine, die die humoralen Antikörper bestimmt, die gegen die Arthropodenproteine gerichtet sind. Die umfaßten Allergien sind meistens gegen Insekten gerichtet. Die relevanten Antikörper sind meistens von der IgE Klasse, aber auch IgG-Antikörper können wichtige Information über die Allergie liefern. Im Normalfall umfaßt diese Methode den Kontakt einer Körperflüssigkeit aus einem Patienten mit einem Polypeptid der Erfindung. Die Mengenverhältnisse und Bedingungen

werden so gewählt, daß sich Immunkomplexe zwischen dem Polypeptid und Antikörpern in der Probe in einer Menge ausbilden, die eine Funktion der Menge der Antikörper in der Probe ist. Der Immunkomplex wird dann mit einer der an sich bekannten Methoden gemessen. Etwas spezifischer ausgedrückt, eine bevorzugte Methode des fünften Aspekts der Erfindung besteht darin, eine Probe einer Körperflüssigkeit, die zum Beispiel IgE-Antikörper enthält, mit einem Polypeptid der Erfindung und einem Anti-IgE-Antikörper in Kontakt zu bringen, so daß sich ein IgE-Polypeptid-Anti-IgE-Immunkomplex bildet. Im Normalfall ist entweder das Polypeptid oder der Anti-IgE-Antikörper an eine feste Phase gekoppelt, die entweder unlöslich ist, oder im Testpuffer gefällt werden kann, so daß der Immunkomplex von dem Testpuffer getrennt werden kann. Der Detektionsschritt kann in diesen Varianten unter Verwendung einer analytisch nachweisbaren Gruppe (Markierung) ausgeführt werden, die entweder kovalent an den IgE-Antikörper gekoppelt ist (in diesem Fall ist das Polypeptid an die Festphase gekoppelt) oder an das Polypeptid (in diesem Fall ist der Anti-IgE-Antikörper an die Festphase gekoppelt). Wenn IgG-Antikörper bestimmt werden sollen, dann wird der Anti-IgE-Antikörper durch einen Anti-IgG-Antikörper ersetzt.

[0021] Ein sechster Aspekt der Erfindung ist eine Methode, die, vorzugsweise *in vitro*, eine zelluläre Reaktion, insbesondere eine Immunreaktion, auf das Polypeptid der Erfindung mißt und ein rekombinantes oder synthetisches Polypeptid wie im vierten Aspekt beschrieben verwendet, um die zelluläre Reaktion, insbesondere die Immunreaktion, zu stimulieren. Als zelluläre Reaktionen können die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten oder die Proliferation von T-Lymphozyten, gemessen durch Aufnahme von ³H-Thymidin gemessen werden, ebenso die Stimulation von eosinophilen Granulozyten, gemessen durch die Freisetzung von Mediatoren, wie zum Beispiel dem eosinophilen kationischen Protein. Die Proben, die in den oben beschriebenen Methoden verwendet werden, sind meistens aus Blut gewonnen, wie zum Beispiel heparinisiertem Vollblut, Serum oder Plasma.

[0022] Ein siebenter Aspekt der Erfindung betrifft nur das p40 Allergen und besteht darin, durch Messung der Enzymaktivität des p40 Allergens und seiner Homologen, der Argininkinaseaktivität (EC 2.7.3.3), das Vorhandensein von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen zu messen, beispielsweise in Staubproben aus Haushalt oder Betrieben. Die Argininkinase katalysiert die reversible Umwandlung von L-Arginin und Adenosintriphosphat (ATP) in N-Phospho-L-Arginin und Adenosindiphosphat (ADP). Für die Messung der Argininkinaseaktivität sind in der Literatur Standardmethoden beschrieben, die zum Beispiel das entstehende Produkt ADP indirekt messen (Anisike et al., 1975).

[0023] Der achte Aspekt der Erfindung besteht darin, mit Hilfe eines Immunoassays das Vorhandensein der p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen in Proben aus der Umwelt des Menschen zu messen, beispielsweise in Staubproben aus Haushalt oder Betrieben. Der Immunoassay besteht darin, daß man einen monoklonalen Antikörper aus der Maus, der nach Standardmethoden gegen eines der Polypeptide der Erfindung gewonnen wird, oder ein Antiserum aus einem Wirbeltier, wie zum Beispiel, Kaninchen, Ziege, Schaf, Huhn, das gegen eines der Polypeptide der Erfindung gerichtet ist, mit der Umweltprobe in Kontakt bringt, die auf die p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen getestet werden soll. Dabei ist der erste Antikörper oder das Antiserum typischerweise kovalent oder nichtkovalent an eine feste Phase gekoppelt, die Umweltprobe wird in wässriger Lösung oder in einem polaren Lösungsmittel gelöst angeboten. Nach einem Waschschritt wird das gebundene p40, p33, p84 oder p27 Allergen oder seine Homologen mit einem zweiten, markierten monoklonalen Antikörper oder einem Antiserum detektiert.

[0024] Bei diesem Verfahren kann insbesondere ein p40-Homologes aus einer beliebigen Spezies, besonders bevorzugt aus Motte oder Milbe, am meisten bevorzugt aus Hausstaubmilbe, ein p33-Homologes aus einer Schmetterlingsart, insbesondere Motte, ein p84 Homologes aus einer wirbellosen Spezies, insbesondere einer Schmetterlingsart oder/und ein p27-Homologes aus einer beliebigen Spezies, insbesondere von einer Arthropodenart bestimmt werden.

[0025] Der neunte Aspekt der Erfindung besteht darin, aus dem synthetischen oder rekombinanten Polypeptid der Erfindung ein Arzneimittel herzustellen, das zur Hyposensibilisierung (Immunotherapie) von Patienten mit Allergie gegen p40, p33, p84 oder p27 oder deren Homologen eingesetzt werden kann.

[0026] Der zehnte Aspekt der Erfindung besteht darin, solche Fragmente oder Teilpeptide oder Multimere des Polypeptids der Erfindung herzustellen, die zwar ein oder mehrere Epitope, insbesondere IgE, IgG oder/und IgA-Epitope, der p40, p33, p84 oder p27 Allergene oder deren Homologen enthalten, aber nicht oder nur in einem stark eingeschränkten Maß zu einer anaphylaktischen Reaktion führen können. Multimere eines Allergens wirken oftmals weniger anaphylaktisch als Monomere. IgG und IgA-Epitope können eine geringere anaphylaktische Wirkung als IgE-Epitope aufweisen. Diese Derivate der Polypeptide der Erfindung können zu einem Arzneimittel entwickelt werden, das entweder zur passiven Therapie des Effektororgans eingesetzt werden (Nase, Conjunctiva, Lunge), um einer Freisetzung von Mediatoren bei einer späteren Allergenexposition vorzubeugen, oder ebenfalls zu einer aktiven Immunotherapie im Sinne einer Hyposensibilisierung.

[0027] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein diagnostisches Mittel zum Nachweis einer Allergie bei einem Patienten, wobei dieses Mittel ein Polypeptid oder einen Antikörper wie oben beschrieben, enthält.

[0028] Mit den Erkenntnissen der vorliegenden Erfindung ist es möglich, eine speziesspezifische Allergiediagnostik unter Verwendung einer Motte, insbesondere der Dörrobstmotte zu betreiben. Hierzu können die Dörrobstmotte, Extrakte davon, wie etwa Gesamtextrakte oder einzelne Bestandteile, insbesondere in Form von Telextrakten zur Bestimmung einer allergischen Reaktion, beispielsweise als Antigen eingesetzt werden.

[0029] Daneben ist es auch möglich, eine komponentenspezifische Allergiediagnostik durchzuführen, in dem Proben auf die einzelnen, oben beschriebenen Allergene untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Diagnose einer Argininkinase, insbesondere aus einer Motte oder aus einer Milbe, beispielsweise der Hausstaubmilbe, von besonders großem Interesse. Aber auch die anderen identifizierten Allergene sowie deren Homologen aus Arthropoden können für eine komponentenspezifische Allergiediagnostik herangezogen werden.

[0030] Auf Grund der hierin präsentierten Ergebnisse kann eine Argininkinase zur Herstellung eines Arzneimittels oder/und eines diagnostischen Mittels zur Behandlung von allergischen Erkrankungen oder/und zur Bestimmung von Allergenen verwendet werden. Bevorzugt wird hierzu eine Argininkinase aus einem Arthropoden, insbesondere aus Motte oder aus Milbe, z. B. Hausstaubmilbe eingesetzt bzw. ein Test auf das Vorhandensein einer solchen Argininkinase

durchgeführt. Bei der Argininkinase handelt es sich bevorzugt um p40 oder eine Argininkinase, die zu p40 eine Identität von > 20%, insbesondere > 50%, bevorzugt > 70% und am meisten bevorzugt > 80%, aufweist und bevorzugt mit p40 konzentriert.

[0031] Grundsätzlich eröffnet sich somit eine breite Verwendung der erfindungsgemäß gefundenen Allergen und der dafür kodierenden Nukleinsäuren auf medizinisch-diagnostischem, umweltanalytischem und therapeutischem Gebiet. 5

[0032] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die beigelegten Figuren weiter erläutert. Die Figuren zeigen:

[0033] **Fig. 1:** Immunoblotstreifen mit Gesamtextrakt aus Larven der Dörrobstmotte, untersucht auf IgE in den Seren von 90 Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen (H1–H90, jeweils oberer Teil). Im jeweils unteren Teil wurden Immunoblotstreifen mit rekombinantem p40 Allergen mit Hexahistidinag mit denselben Seren geprobt. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern sind auf der linken Seite in kDa angegeben. K ist die Pufferkontrolle ohne Zugabe von Serum. 10

[0034] **Fig. 2:** Immunoblotstreifen mit Gesamtextrakt aus Larven der Dörrobstmotte (jeweils oberer Teil), untersucht auf IgE in den Seren von Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen plus atopischer Dermatitis (AH1–AH12), von Patienten mit Pollenallergie ohne angegebene Beschwerden im Haus (P1–P20) und von Normalpersonen (N1–N10). Im jeweils unteren Teil wurden Immunoblotstreifen mit rekombinantem p40 Allergen mit Hexahistidinag mit denselben Seren untersucht. Die Positionen von Molekulargewichtsmarkern sind auf der linken Seite in kDa angegeben. K ist die Pufferkontrolle ohne die Zugabe von Serum. 15

[0035] **Fig. 3:** cDNA (SEQ ID No. 1) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 2) des Allergens p40 aus *Plodia interpunctella* 20

[0036] **Fig. 4:** cDNA (SEQ ID No. 3) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 4) des Allergens p33 aus *Plodia interpunctella*

[0037] **Fig. 5:** cDNA (SEQ ID No. 5) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 6) des Allergens p84 aus *Plodia interpunctella*

[0038] **Fig. 6:** cDNA (SEQ ID No. 7) und davon abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID No. 8) des Allergens p27 aus *Plodia interpunctella* 25

[0039] **Fig. 7:** IgE-Immunoblot. Streifen mit rekombinantem p40 Fusionsprotein mit einer Zellulose-bindenden Domäne wurden mit einer Auswahl der oben beschriebenen Seren getestet. Auf der rechten Seite sind die Molekulargewichtsmarker angegeben

[0040] **Fig. 8:** Soforttypreaktionen beim Hauttest mit dem rekombinanten p40 Allergen mit Hexahistidinag. 30

a: Pricktest bei dem mottenallergischen Patienten AH11. Keine Hautreaktivität auf Konzentrationen Nr. 10 und 9. Quaddeln und Rötung bei den Konzentrationen Nr. 8 (3.12 ng/μl) bis Nr. 5 (25 ng/μl). Die höheren Konzentrationen wurden nicht mehr getestet. ++ Positivkontrolle (Histamindihydrochlorid), – Negativkontrolle (0,9% NaCl). Die Quaddeln sind mit einem Stift markiert. 35

b: Reibetest am kontralateralen Unterarm desselben Patienten, starke Quaddelbildung und Hautrötung in den Konzentrationen Nr. 2 (200 ng/μl) und Nr. 3 (100 ng/μl).

c: Vergrößerung des Bereichs von **Fig. 8a** bevor die Quaddeln angezeichnet wurden. Die urtikarielle Reaktion mit der Bildung von Pseudopodien (Nr. 6) ist gut zu erkennen.

d: Vergrößerung von **Fig. 8b**: Quaddelbildung im Reibetest bei der Konzentration Nr. 2 nach 20 min. 40

[0041] **Fig. 9:** Spätphasenreaktionen nach 24 h bei der Hauttestung mit dem rekombinanten p40 Allergen mit Hexahistidinag.

a: Reibetest: ekzematöse Reaktion in den Konzentrationen Nr. 6 (12.5 ng/μl) bis Nr. 2 (200 ng/μl). Nr. 1 wurde nicht durchgeführt. 45

b: Reibetest: keine ekzematöse Reaktionen in den Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 7.

c: Vergrößerung von **Fig. 9a**: Ekzematöse Reaktion bei Konzentration Nr. 4.

d: Pricktest: Infiltrierte Papeln innerhalb der markierten Grenzen der vorangegangenen Soforttyp-Reaktion. 50

[0042] **Fig. 10:** Immunoblot-Inhibitionsexperiment. Drei mit rekombinantem p40 Allergen aus der Dörrobstmotte positive Seren wurden verwendet, um mit und ohne Präinkubation mit rekombinantem p40 allergenhaltige Extrakte aus verschiedenen Spezies (Dörrobstmotte, Küchenschabe, Hausstaubmilbe, Hummer, Garnele, Miesmuschel und Kabeljau) zu testen. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite der Immunoblots angegeben, von oben nach unten 66, 46, 30 und 21 kDa. 55

SEQ ID No. 1 zeigt die cDNA des Allergens p40 aus *Plodia interpunctella*,

SEQ ID No. 2 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 3 zeigt die cDNA des Allergens p33 aus *Plodia interpunctella*,

SEQ ID No. 4 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 5 zeigt die cDNA des Allergens p84 aus *Plodia interpunctella*,

SEQ ID No. 6 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz,

SEQ ID No. 7 zeigt die cDNA des Allergens p27 aus *Plodia interpunctella*, und

SEQ ID No. 8 zeigt die davon abgeleitete Proteinsequenz. 60

- 5 Test von verschiedenen Gruppen von Allergikern und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen Mottenantigene aus Larven der Dörrobstmotte *P. interpunctella*

[0043] Da im klinischen Bereich eine mögliche Allergie gegen Motten bislang kaum Beachtung gefunden hat, konnte bei der Auswahl der Patienten keine Gruppe definiert werden, die klinische Beschwerden nach Kontakt mit Mottenallergenen als Symptom angab. Deshalb stellten wir für unsere Arbeit die folgenden Gruppen zusammen, die auf IgE-Antikörper gegen Mottenproteine getestet wurden:

1. Patienten mit Typ I allergischen Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 90, Patienten H1–H90),
- 15 2. Patienten mit atopischer Dermatitis und Typ I allergischen Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 12, Patienten AH1–AH12),
3. Patienten mit nachgewiesener Pollenallergie ohne Typ I allergische Beschwerden (Rhinitis, Conjunctivitis, allergisches Asthma bronchiale) in Innenräumen (n = 20, Patienten P1–P20),
4. Probanden ohne atopische Dermatitis und ohne nachgewiesene Typ I Allergien (n = 10, Probanden N1–N10).

IgE-Reaktivität von natürlichen Mottenextrakten

[0044] Präparationen von zwei verschiedenen Mottenspezies wurden verwendet, um mottenspezifische IgE-Antikörper in Patientenseren zu detektieren. Die eine Präparation ist ein kommerziell erhältliches Homogenisat von Faltern der Mehlmotte *Ephestia kuehniella* (Allergon, Pharmacia Upjohn, Uppsala, Schweden). Die andere Präparation wurde aus Mottenlarven (Wanderstadium, kurz vor der Verpuppung) von der Dörrobstmotte *Plodia interpunctella* hergestellt. Die Insektenproben (5 Larven) wurden in 0,2 ml PBS homogenisiert, im Verhältnis von 1 : 1 mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Fling und Gregerson, 1986). Es wurde ein präparatives Gel verwendet, auf das etwa 20 µg Gesamtprotein pro cm aufgetragen wurden. Als Marker diente ein Rainbow-Marker (Amersham Pharmacia). Das Gel wurde nach der Elektrophorese auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) geblottet (Towbin et al., 1979) und in 0,5 cm Streifen geschnitten.

[0045] Der Test der Patientenseren auf IgE gegen Motten wurde analog zu der von Jarolim et al. (1989) beschriebene Methode durchgeführt. Die Streifen wurden 2 × 5 min und 1 × 30 min in Puffer G (42 mM Na₂HPO₄, 6,4 mM NaH₂PO₄, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin, 0,05 % (w/v) NaN₃, pH 7.5) bei Raumtemperatur abgesättigt, dann in 1 ml Volumen in 1 : 10 (wenn nicht anders beschrieben) mit Puffer G verdünnten Patientenseren über Nacht bei 4°C gekippt. Die Streifen wurden 2 × 5 min und 1 × 30 min bei Raumtemperatur in Puffer G gewaschen, dann über Nacht mit einer 1 : 10 Verdünnung eines ¹²⁵I-markierten Anti-Human-IgE Antikörpers (Amersham Pharmacia) bei Raumtemperatur gekippt, wie oben gewaschen, getrocknet und aufgeklebt. Gebundenes mottenspezifisches IgE wurde so mit dem radioaktiv markierten Anti-IgE-Antikörper detektiert und die positiven Signale wurden mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (Kodak) sichtbar gemacht.

[0046] Die Fig. 1 zeigt in ihrem oberen Teil die Resultate dieses Experiments für die Gruppe der "Indoor"-Allergiker (Patienten mit allergischen Beschwerden in Innenräumen), Fig. 2 zeigt im oberen Teil die Ergebnisse für die anderen drei Gruppen. Die Ergebnisse sind auch weiter unten in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

[0047] Zusammenfassung der IgE-Immunoblotresultate gegen verschiedene Allergenextrakte und gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidinag aus der Dörrobstmotte. +++ , sehr starke Reaktion; ++ starke Reaktion mit mindestens zwei starken positiven Banden; + schwache positive Reaktion mit mindestens einer sichtbaren Bande; – keine definierte positive Bande beobachtet.

DE 100 41 541 A 1

Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His ₆)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe	
H1	+	+	-	-	-	5
H2	-	-	-	-	-	
H3	-	-	-	-	-	
H4	-	-	-	-	-	
H5	++	+	-	++	+	10
H6	-	-	-	-	-	
H7	++	++	-	-	-	
H8	-	-	-	-	-	
H9	+	+	-	-	-	15
H10	-	-	-	-	-	
H11	-	-	-	-	-	
H12	-	-	-	-	-	
H13	++	++	-	-	++	20
H14	-	-	-	-	-	
H15	-	-	-	-	-	
H16	-	-	-	+	-	
H17	+	-	-	-	-	
H18	-	-	-	-	-	25
H19	-	-	-	-	-	
H20	+++	+++	+++	++	+++	
H21	+	+	-	++	-	
H22	+	+	-	+	-	30
H23	-	-	-	-	-	
H24	-	-	-	-	-	
H25	-	-	-	-	-	
H26	-	-	-	-	-	
H27	-	-	-	-	-	35
H28	++	++	-	++	++	
H29	-	+	-	+	-	
H30	-	-	-	-	-	
H31	-	+	-	-	-	40
H32	++	++	+++	-	+	
H33	+	+	-	-	-	
H34	-	-	-	-	-	
H35	+	+	-	-	+	45
H36	-	-	-	-	-	
H37	-	-	-	-	-	
H38	+	-	-	-	-	
H39	++	+	++	+	-	50
H40	+	+	-	-	+	
H41	+	-	-	-	-	
H42	+	-	-	-	-	
H43	-	-	-	-	-	
H44	-	-	-	-	-	
H45	+	-	-	+++	-	55
H46	+	+	-	+	-	

60

65

	Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His ₆)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe
5	H47	-	-	-	-	-
	H48	+	-	-	-	-
	H49	-	+	-	-	-
10	H50	-	-	-	-	-
	H51	-	-	-	-	-
	H52	-	-	-	-	-
	H53	++	++	-	+	++
15	H54	+	-	-	-	-
	H55	-	+	-	-	-
	H56	-	-	+	-	-
	H57	++	+	-	-	-
20	H58	++	-	+	++	-
	H59	-	-	-	-	-
	H60	-	-	-	-	-
	H61	+	-	-	-	-
25	H62	+	-	-	-	-
	H63	+	-	-	-	-
	H64	+	-	-	-	-
30	H65	-	-	-	-	-
	H66	-	+	-	-	-
	H67	-	-	-	-	-
	H68	-	-	-	-	-
35	H69	+	+	-	-	-
	H70	++	++	-	-	++
	H71	-	-	-	-	-
	H72	+	-	+	+	-
40	H73	++	+	-	-	-
	H74	-	+	-	-	-
	H75	-	-	-	-	-
	H76	+++	++	-	-	++
45	H77	-	-	-	-	-
	H78	++	++	+	-	+
	H79	+	++	-	-	++
	H80	+	+	-	-	-
50	H81	+++	+++	+	-	+++
	H82	+	++	-	-	+
	H83	-	-	-	-	-
55	H84	+	-	-	+	-
	H85	-	-	-	-	-
	H86	++	+	+	-	+
	H87	-	-	-	+	-
60	H88	-	-	-	-	-
	H89	+++	+	+++	+	+
	H90	-	-	-	+++	-

65

Patient	Dörrobst- motten- larven	Mehl- motten- falter	Rek. p40 Allergen (His ₆)	Haus- staub- milbe	Küchen- schabe	
AH1	-	-	-			5
AH2	+	-	-	+	-	
AH3	+	-	-			
AH4	+	-	-			10
AH5	+	+	-	-	-	
AH6	+	-	-			
AH7	-	-	-			
AH8	++	++	+	+++	++	15
AH9	+	+	-	-	-	
AH10	+++	+++	+	+++	++	
AH11	+++	+++	+++	+++	+++	
AH12	++	+++	-	+++	+	20
P1	+	-	-			
P2	-	-	-			
P3	-	-	-			
P4	+++	+++	+++	+	+++	25
P5	+	+	-	++	+	
P6	-	-	-	-	-	
P7	+	-	-	-	+	30
P8	-	-	-	-	-	
P9	+++	+++	-	+	++	
P10	-	-	-			
P11	-	-	-			35
P12	+	-	-	-	+	
P13	-	-	-	-	-	
P14	-	-	-			
P15	+	-	-	-	-	40
P16	+	-	-	-	-	
P17	-	-	-			
P18	-	-	-			
P19	+	++	-	+	+	45
P20	+	++	-	+	+	
N1	-	-	-	-	-	
N2	-	-	-	-	-	50
N3	-	-	-	-	-	
N4	-	-	-	-	-	
N5	-	-	-	-	-	
N6	-	-	-			55
N7	-	-	-			
N8	-	-	-			
N9	-	-	-			
N10	-	-	-			60

[0048] Insgesamt wurden bei den "Indoor"-Allergikern (n = 90) beim IgE-Immunoblot mit dem Dörrobstmottenlarven-Gesamtextrakt 4 sehr stark positive, 13 stark positive und 25 schwach positive Reaktionen beobachtet, bei den Atopikern mit allergischen Beschwerden in Innenräumen (n = 12) 2 sehr stark positive, 2 stark positive und 6 schwach positive. Bei den Pollenallergikern ohne angegebene allergische Beschwerden in Innenräumen (n = 20) gab es 2 sehr stark positive und 8 schwach positive Reaktionen. Insgesamt wurde bei 51% der Patienten eine positive Reaktion auf Mottenlarvenproteine beobachtet. Keine der nichtallergischen Kontrollpersonen zeigte eine Reaktion im Immunoblot.

Test auf IgE-Antikörper gegen Proteine der Mehlmotte (*E. kuehniella*) im Falterstadium

[0049] Das gleiche Patientenkollektiv wie oben wurde auf Streifen mit einem kommerziell erhältlichen Extrakt aus der Mehlmotte untersucht, wobei die Ergebnisse auch in der Tabelle 1 dargestellt sind. Insgesamt zeigten 36% der Allergiker eine positive Reaktion auf Mottenfalter.

Test auf IgE-Antikörper gegen Proteine der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) und der Küchenschabe (*Blattella germanica*)

[0050] Ausgewählte Patienten und Normalpersonen aus dem Kollektiv wurden auf Streifen mit kommerziell erhältlichen Extrakten aus der Hausstaubmilbe und der Küchenschabe getestet. Die Ergebnisse sind wieder in Tabelle 1 dargestellt. Die Küchenschabe ist ein flügelloses Insekt und näher mit der Dörrobstmotte verwandt als die Hausstaubmilbe, die zu den Spinnentieren zählt. Alle drei zählen zu den Gliederfüßlern (Arthropoden). Trotz der phylogenetischen Verwandtschaft der drei Spezies ist die IgE-Reaktivität der Patienten oft stark unterschiedlich. So reagiert zum Beispiel Patient H81 sehr stark auf Motte und Küchenschabe, aber nicht auf die Hausstaubmilbe. Patient H90 reagiert nur sehr stark mit der Milbe, aber nicht mit Schabe oder Motte. Patienten H7, H9, H33, H80, AH5 und AH9 reagieren auf Mottenlarven und Falter, aber nicht auf Schabe oder Milbe.

Beispiel 2

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p40 kodiert

Konstruktion einer cDNA-Bank von *Plodia interpunctella*

[0051] Die Insekten (*Plodia interpunctella*) wurden in Haferflocken angezüchtet (S, Prozell, M. Schöller, Institut für Vorratsschutz, Biologische Bundesanstalt, Berlin). 180 Larven im späten Wanderstadium, kurz vor der Verpuppung (2,4 g) wurden zur Präparation von RNA eingesetzt. Die Larven wurden in 30 ml Trizol Reagens (Life Technologies, Frederick, MY, USA) homogenisiert, und aus der wäßrigen Phase wurde nach dem Protokoll des Herstellers die RNA gewonnen. Aus 5 µg der erhaltenen Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des PolyATtract Systems (Promega, Madison, WI, USA) polyA⁺ RNA gewonnen. Die mRNA wurde in cDNA überschrieben und diese mit Hilfe des Uni-ZAP Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf gerichtete Weise in λ ZAP Phagen eingebaut. Die primäre Bank enthielt 3 × 10⁶ cDNA Klone und wurde nach Standardmethoden amplifiziert.

IgE-Immunoscreening und Analyse der immunpositiven Klone

[0052] Zum Screening einer cDNA-Bank von *Plodia interpunctella* wurden Seren der Patienten AH11 (Screen 1), H20 (Screen 2) und AH10 und AH12 (Screen 3) verwendet. 360000 (Screen 1) oder 200000 (Screen 2, 3) Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden auf einem Rasen von *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) Zellen in einer Dichte von 15000 Phagen pro Petrischale mit 140 mm Durchmesser ausplattiert. Die Synthese von rekombinanten Proteinen wurde durch Auflegen von Nitrozellulosefiltern (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) induziert, die mit einer 10 mM IPTG (Isopropylthio-β-D-Galaktosid) Lösung getränkt waren (Huynh et al., 1985). 31 (Screen 1, Patient AH11) bzw. 11 (Screen 2, Patient H20) und 6 (Screen 3, Patienten AH10 und AH12) immunpositive Klone wurden jeweils mit Hilfe von Patientenserum und von ¹²⁵I-markierten, gegen humanes IgE gerichteten Antikörpern (Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Schweden) nach etablierten Methoden (Breiteneder et al., 1989; Valenta et al., 1991; Vrtala et al., 1993) isoliert.

DNA-Sequenzanalyse der immunpositiven Klone

[0053] Aus den positiven Phagen wurden durch "in vivo excision" (Short et al., 1988) mit Hilfe von Helferphagen (Stratagene, La Jolla, CA) die entsprechenden cDNA Plasmide gewonnen und nach Standardmethoden isoliert. Die DNA wurde mit Hilfe von Thermosequenzase (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) und IRD800-markierten Primern (MWG Biotech, Ebersberg) auf einem LI-COR Sequenzer (LI-COR, Lincoln, NE) analysiert. Die Basensequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Hilfe des FastA-Programms (Pearson und Lipman, 1988) mit der SwissProt Datenbank verglichen. Alle Klone wurden mit Hilfe des GAP Programms aus dem UWGCG Programmpaket (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) miteinander verglichen. Auf diese Weise und mit Hilfe des Vergleichs zu den homologen Proteinen wurden Klone identifiziert, die einen kompletten Leserahmen aufwiesen.

[0054] Beim Screening von 360000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank mit dem Serum AH11 wurden 31 immunpositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden zunächst mit EcoRI und XhoI gespalten und auf einem Agarosegel wurden die Schnittmuster analysiert. Alle analysierbaren Klone enthielten dieselbe cDNA. Der längste verfügbare Klon wurde sequenziert (Fig. 3) und der offene Leserahmen, der ein Polypeptid von vorhergesagten 40 kDa (p40) darstellte, wurde mit den Datenbanken verglichen. Es zeigte sich, daß das gefundene Polypeptid (Fig. 3) über die gesamte Länge mit Argininkinasen verschiedener Spezies homolog war. Argininkinasen können die terminale Phosphatgruppe von ATP auf Arginin übertragen und so einen Energiereservestoff bilden. Bislang sind Argininkinasen nicht als Allergene identifiziert worden (siehe auch Einleitung). Die dem p40 Allergen am nächsten verwandte Argininkinase aus der Honigbiene (Kucharski und Maleszka, 1998) weist 85% Aminosäure-Sequenzidentität mit p40 auf.

DE 100 41 541 A 1

Beispiel 3

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p33 kodiert

[0055] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit dem Serum H20 gescreent, dabei wurden 11 immunopositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. 10 der 11 Klone kodierten für das gleiche Protein. Drei der Klone hatten die volle Länge, und zwei von ihnen hatten die identische Sequenz, die in **Fig. 4** dargestellt ist. Der offene Leserahmen stellt ein Allergen von 33 kDa dar (p33), das mit Tropomyosinen verschiedener Spezies eng verwandt ist. Tropomyosine sind als kreuzreagierende Allergene besonders auch aus dem Bereich der Nahrungsmittelallergie bekannt (Reese et al., 1999).

Beispiel 4

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p84 kodiert

[0056] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit den Seren AH10 und AH12 gescreent, dabei wurden 6 immunopositive Klone erhalten. Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. Nur einer der Klone (Sequenz **Fig. 5**) kodierte für ein Protein in voller Länge, es handelte sich um ein homologes zu Arylphorinen. Arylphorine gelten als Speicherproteine von Insekten und enthalten einen hohen Anteil an Tyrosin. Ein Arylphorin der Schabe (*Periplaneta americana*) ist bereits in einer Publikation (Wu et al., 1996) als Allergen beschrieben.

Beispiel 5

Isolierung und molekulare Charakterisierung eines cDNA Klons, der für das *P. interpunctella* Allergen p27 kodiert

[0057] 200000 Phagen der λ ZAP cDNA Bank wurden wie oben beschrieben mit dem Serum H20 gescreent (Screen 2), ebenso viele mit den Seren AH 10 und AH12 (Screen 3). Die in vivo exzidierten Plasmide wurden wie oben analysiert und sequenziert. Einer der Klone von Screen 2 und drei der Klone von Screen 3 kodierten für das gleiche Protein. Ein Sequenzvergleich der durch Übersetzung erhaltenen Aminosäuresequenz ergab eine signifikante Ähnlichkeit mit einer Glukose 1-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* (36 % Sequenzidentität, Nagao et al., 1992). Es gab auch eine kleinere aber noch signifikante Ähnlichkeit mit dem Alt a 2 Allergen aus dem Pilz *Alternaria alternata* (26% Sequenzidentität, De Vouge et al., 1998), einer Aldehyddehydrogenase, und dem Bet v 5 Allergen aus der Birke (20% Sequenzidentität, Karamloo et al., 1999), einer Isoflavonreduktase. Bei dem p27 Allergen handelt es sich also um ein Redoxenzym. Die Sequenz ist in **Fig. 6** dargestellt.

Beispiel 6

Expression des p40 Allergens mit einem Hexahistidintag und als Fusionsprotein in *E. coli*

[0058] Die p40 cDNA wurde auf zwei verschiedene Weisen in pET-Expressionsvektoren inkloniert so daß das p40 Allergen einmal nur mit einem Hexahistidintag und einmal als Fusionsprotein mit einer Zellulosebindenden Domäne erzeugt wurde. Das erste Konstrukt wurde unter nativen Bedingungen gereinigt. Das zweite Konstrukt wurde über eine Zellulosesäule gereinigt. Sowohl das Fusionsprotein mit einer zellulosebindenden Domäne als auch das Nichtfusionsprotein mit Hexahistidintag besaßen Argininkinaseaktivität.

Konstruktion eines Expressionsvektors zur Expression des p40 Allergens mit einem Hexahistidin-"Tag"

[0059] Die komplette cDNA wurde in zwei Stufen in die EcoRI und XhoI Schnittstellen des Plasmids pET23(+) (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) inkloniert. Die Ribosomenbindungsstelle wurde mit Hilfe der Oligonukleotidabhängigen Mutagenese nach Kunkel et al., (1987) in den Expressionsvektor eingebaut. Dazu wurde das Mutageneseoligonukleotid 5' -GGT AGC GGC GTC CAC CAT GGT ATA TCT CCT TCT AGA GGG AAA CCG-3' verwendet. Der entstandene Vektor pETAK1 wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft. In dem Vektor wurde dann am carboxyterminalen Ende der Sequenz durch eine zweite Mutagenese mit dem Oligonukleotid 5'-ATC TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAG GGA TTT CTC GAT TTT GAT-3' ein Hexahistidintag für die Reinigung über eine Nickelaffinitätssäule (Qiagen, Hilden, Deutschland) in das Expressionsplasmid eingebracht, und es entstand der Vektor pETHisAK1, der durch Sequenzierung überprüft wurde.

Expression und Reinigung des p40 Allergens als Nichtfusionsprotein mit einem Hexahistidin-"Tag"

[0060] Der Vektor pETHisAK1 wurde in *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformiert und die transformierten Zellen in einer 400 ml Kultur bei 37°C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,8. Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) von IPTG (Isopropyl- β -D-Galaktosid) induziert, und die Kultur wurde noch 3 h bei 37°C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, dann wurden die Zellen 10 min in Lysepuffer (100 mM KCl, 50 mM Mes, 4% (v/v) Triton X-100, 8 mM DTT, 8 mM EDTA, 25 μ g/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7.5) behandelt (Schupp et al., 1995). Zelldetritus wurde 30 min bei 2000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das Protein wurde mit Hilfe von zentrifugierbaren Kleinsäulen unter nativen Bedingungen durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie gereinigt wie vom Hersteller (Qiagen) beschrieben.

Konstruktion eines Expressionsklons zur Expression des p40 Allergens als Fusionsprotein

[0061] Die komplette cDNA, die für das p40 Allergen kodiert, wurde in den Expressionsvektor pET36b (Novagen) nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) unter Verwendung der EcoRI und XhoI Restriktionsstellen umkloniert. Dies geschah in zwei Stufen, da die cDNA eine interne XhoI-Stelle aufwies. Der noch fehlende Übergang zwischen der Sequenz, die für die Zellulose bindende Domäne kodiert und der Sequenz, die für die Argininkinase kodiert, wurde mit Hilfe der Oligonukleotid-abhängigen Mutagenese nach Kunkel et al., (1987) in den Expressionsvektor eingebaut.

[0062] Dazu wurde das Mutageneseoligonukleotid 5'-GGT AGC GGC GTC CAC CAT GGT ATA TCT CCT TCT AGA GGG AAA CCG-3' verwendet. Der entstandene Vektor pCBDAK1 wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft.

Expression eines Fusionsproteins aus einer Zellulose-bindenden Domäne und dem p40 Allergen

[0063] Der Vektor pCBDAK1 wurde in Escherichia coli BL21 (DE3) transformiert und die transformierten Zellen in einer 400 ml Kultur bei 37°C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,8. Die Synthese des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) von IPTG (Isopropyl- β -D-Galaktosid) induziert, und die Kultur wurde noch 3 h bei 37°C weitergeschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, dann wurden die Zellen 10 min in Lysepuffer (100 mM KCl, 50 mM Mes, 4% (v/v) Triton X-100, 8 mM DTT, 8 mM EDTA, 25 μ g/ml Polymyxin B Sulfat (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7.5) behandelt (Schupp et al., 1995). Zelldetritus wurde 30 min bei 2000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das Fusionsprotein wurde durch Zellulose-Affinitätschromatographie gereinigt wie vom Hersteller (Novagen) beschrieben.

Test des rekombinanten p40 Allergens mit Hexahistidintag und des Fusionsproteins aus einer Zellulose-bindenden Domäne und dem p40 Allergen auf IgE-Reaktivität

[0064] Das gereinigte p40 Allergen mit einem Hexahistidintag wurde wie oben beschrieben in einer Konzentration von 10 μ g pro cm auf einem präparativen 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert, auf Nitrozellulose geblottet und mit jenen Patientenseren getestet, die in den oben beschriebenen Experimenten mit dem Extrakt von *P. interpunctella* Larven getestet worden waren.

[0065] Das gereinigte rekombinante Fusionsprotein wurde wie oben beschrieben in einer Konzentration von 5 μ g pro cm auf einem präparativen 12,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert, auf Nitrozellulose geblottet und mit jenen Patientenseren getestet, die in den oben beschriebenen Experimenten mit dem Extrakt von *P. interpunctella* Larven positive Signale ergeben hatten.

Test der oben beschriebenen Patienten und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag

[0066] Alle Seren der oben beschriebenen Patienten und Normalpersonen wurden auf gleiche Weise wie oben beschrieben auf IgE-Antikörper gegen das gereinigte p40 Allergen mit Hexahistidintag getestet (Fig. 1, 2, Tabelle 1). Bei diesem Versuch zeigte sich eine Reaktivität nur im Molekulargewichtsbereich bei 40 kDa, deshalb ist ein schmalerer Ausschnitt der Immunoblots unter den Blots mit Larvenproteinen dargestellt. Insgesamt waren 10 von 90 "Indoor"-Allergikern positiv, 3 von 12 Atopikern mit "Indoor"-Allergie und einer von 20 Pollenallergikern ohne angegebene allergischen Beschwerden in Innenräumen. Das bedeutet, dass 11% der Patienten H1–H90 und 23% der Patienten AH1–AH12 IgE gegen Larven der Dörrobstmotte hatten.

Test von Patienten und Normalpersonen auf IgE-Antikörper gegen das rekombinante p40 Fusionsprotein mit Zellulose-bindender Domäne

[0067] Eine Auswahl der oben beschriebenen Seren wurde auf IgE gegen das rekombinante p40 Fusionsprotein getestet (Beispiele in Fig. 7). Auch das rekombinante p40 Fusionsprotein war geeignet, IgE-Antikörper gegen das natürliche p40 Antigen nachzuweisen.

Beispiel 7

Hauttests

[0068] Das gereinigte rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag wurde in steriler 0,9% NaCl-Lösung auf 10 verschiedene Konzentrationen eingestellt: Nr. 1 enthielt 400 ng/ μ l, die weiteren Proben enthielten absteigende Konzentrationen von 200 ng/ μ l (Nr. 2), 100 ng/ μ l (Nr. 3), 50 ng/ μ l (Nr. 4), 25 ng/ μ l (Nr. 5), 12,5 ng/ μ l (Nr. 6), 6,25 ng/ μ l (Nr. 7), 3,13 ng/ μ l (Nr. 8), 1,56 ng/ μ l (Nr. 9) und 0,78 ng/ μ l (Nr. 10). Vor dem intrakutanen Hauttest wurde am kontralateralen Arm ein Reibetest mit je 30 μ l der Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 2 durchgeführt und nach 5, 10 und 20 min sowie 24 h abgelesen. Die Negativkontrolle war 0,9% NaCl, als Positivkontrolle wurde Histamindihydrochlorid in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Basierend auf den Ergebnissen des Reibetests wurde dann der Pricktest in den Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 5 durchgeführt und jeweils nach 20 min und 24 h abgelesen.

[0069] Der mottenallergische Patient AH11 wurde gegen das rekombinante p40 Allergen mit Hexahistidintag zuerst im Reibetest und dann im Pricktest untersucht. Im Reibetest (Fig. 8b) riefen die Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 6 keine Sofortreaktionen hervor, die Konzentration Nr. 5 induzierte einen leichten Juckreiz im Probegebiet. Nr. 4 rief nach 5–10 Minuten winzige Quaddeln hervor. Nr. 3 und Nr. 2 riefen multiple Quaddeln (Durchmesser 4–5 mm) hervor. Diese hatten nach 15–20 min die maximale Ausprägung (Fig. 8d) und bildeten sich alle nach 45 min zurück.

[0070] Nach dem Reibetest wurde der Pricktest mit den gleichen Verdünnungen (Nr. 10 bis Nr. 5) in aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt (**Fig. 8a**). Auf die Konzentrationen Nr. 10 und Nr. 9 wurde keine unmittelbare Hautreaktion beobachtet. Quaddeln und Hautrötung traten in den Konzentrationen Nr. 8 (3,12 ng/μl) bis Nr. 5 (25 ng/μl) auf. Der Durchmesser der Quaddeln war zwischen 7 mm (Konzentration Nr. 8) und 15 mm (Konzentration Nr. 6) (**Fig. 8c**). Aufgrund der Stärke der Reaktionen von den Konzentrationen Nr. 8 bis Nr. 5 wurden Konzentrationen Nr. 4 bis Nr. 1 nicht getestet. Die Quaddeln wurden zur Dokumentation bei ihrer maximalen Ausprägung nach 20 min mit einem Stift markiert und bildeten sich nach 45 min spontan zurück.

[0071] Bei der Ablesung nach 24 h wurden innerhalb der markierten Grenzen der vorangegangenen Soforttyp-Reaktionen akzematoider Papeln als Spätphasenreaktion des Pricktests beobachtet (**Fig. 9d**). Der kontralaterale Arm, an dem der Reibetest durchgeführt worden war, zeigte eine ausgeprägte ekzematöse Reaktion im Gebiet der Konzentrationen Nr. 6 bis Nr. 4 (**Fig. 9a, c**), während bei den niedrigeren Konzentrationen Nr. 10 bis Nr. 7 keine ekzematöse Reaktion beobachtet wurde (**Fig. 9b**).

Beispiel 8

Immunoblot-Inhibition und Nachweis der Kreuzreaktivität des p40 Allergens mit Allergenen verschiedener Spezies

[0072] Aus der Literatur ist bekannt, daß eine enzymatische Argininkinaseaktivität praktisch in allen untersuchten Invertebraten vorkommt. Um zu überprüfen, welche immunologische Ähnlichkeiten zwischen dem p40 Allergen der Dörrobstmotte und den Homologen in anderen Spezies bestehen, wurde ein Immunoblot-Inhibitionsexperiment durchgeführt. Allergenextrakte aus der Milbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Küchenschabe (*Blattella germanica*), Garnele (*Penaeus monodon*), Hummer (*Homarus gammarus*), Miesmuschel (*Mytilus edulis*), und Kabeljau (*Gadus morhua*) als einzigem Vertebraten wurden entweder eingekauft (Milbe und Schabe) oder aus frisch eingekauftem, ungekochten Muskelfleisch präpariert.

[0073] Die Gesamtallergene von der Milbe und der Küchenschabe stammten von Pharmacia/Allergon. Die verschiedenen Meeresfrüchte wurden in frischem, ungekochten Zustand auf dem Naschmarkt in Wien erworben. Es wurde so gut wie möglich nur Muskelfleisch verarbeitet. Die verschiedenen Proben (1–5 g) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, in der Reibschale zerrieben, mit 3 ml pro g Probe in eiskaltem bidest. H₂O mit 5 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) 1 h bei 4°C gerührt. Ein Volumen Auftragspuffer (Fling und Gregerson, 1986) wurde zugesetzt und die Proben wurden 10 min bei 95°C denaturiert, unlösliche Bestandteile wurden 10 min bei 14500 Upm und 4°C abzentrifugiert, und die Proteinkonzentration der Extrakte wurde auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt. Wie oben wurden präparative Gele mit 200 μg Protein pro cm gefahren, auf Nitrozellulose gebロットet und in Streifen geschnitten.

[0074] Das Serum des Patienten AH11 und von den Patienten H89 und H32 wurde in der Konzentration 1 : 10 mit Puffer G (42 mM Na₂HPO₄, 6,4 mM NaH₂PO₄, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin, 0,05% (w/v) NaN₃, pH 7.5) verdünnt. Je 1 ml der Proben wurde entweder mit 10 μg des rekombinanten p40 Allergens mit Hexahistidintag in Puffer G, oder nur in Puffer G über Nacht bei 4°C präinkubiert, und dann wurde je mit einem Streifen Nitrozellulose mit gebლობteten Extrakten die IgE-Reaktivität bestimmt. Das gebლობte IgE wurde wie üblich mit jodmarkierten Antihuman-IgE Antikörpern detektiert.

[0075] Bei allen untersuchten Invertebratenspezies reagierten die Seren mit einer Bande im Bereich von 40 kDa, die durch Präinkubation mit dem rekombinanten p40 Allergen aus der Dörrobstmotte entweder ausgelöscht (Dörrobstmotte, Hausstaubmilbe) oder abgeschwächt (Küchenschabe, Garnele, Hummer, Miesmuschel) wurde (**Fig. 10**). Im Extrakt aus Kabeljau gab es zwar eine Reihe von allergenen Proteinen, aber keines von ihnen wurde durch Präinkubation mit dem p40 Allergen aus der Motte teilweise oder vollständig inhibiert.

LITERATUR

Anisike E O, Moreland B H, Watts D C (1975) Evolutionary variation between a monomer and a dimer arginine kinase. *Biochem. J.* 145: 535–543.

Arruda L K, Vailes L D, Benjamin D C, Chapman M D (1995) Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 295–297.

Baldo B A, Panzani R C (1988) Detection of IgE antibodies to a wide range of insect species in subjects with suspected inhalant allergies to insects. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85: 278–287.

Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8: 1935–1938.

Davis F M, Jenkins J N (1995) Management of scales and other insect debris: occupational health hazard in a lepidopterous rearing facility. *J. Econ. Entomol.* 88: 185–191.

De Vouge M W, Thaker A J, Zhang L, Muradia G, Rode H, Vijay H M (1998) Molecular cloning of IgE-binding fragments of *Alternaria alternata* allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116: 261–268.

Fling S P, Gregerson D S (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155: 83–88.

Huynh T V et al., In: *cDNA cloning*, Oxford, IRL Press, 1 (1985) 49–78.

Jarolim E, Rumpold H, Endler A T, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D (1989) IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44: 385–395.

Karamloo F, Schmitz N, Scheurer S, Foetisch K, Hoffmann A, Hausteiner D, Vieths S (1999) Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 991–999.

- Komase Y, Sakata M, Azuma T, Tanaka A, Nakagawa T (1997) IgE antibodies against midge and moth found in Japanese asthmatic subjects and comparison of allergenicity between these insects. *Allergy* 52: 75–81.
- Kraft D, Ferreira F, Vrtala S, Breiteneder H, Ebner C, Valenta R, Susani M, Breitenbach M, Scheiner O (1999) The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 171–176.
- 5 Kucharski R, Maleszka R (1998) Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene* 211: 343–349.
- Kunkel T A, Roberts J D, Zakour R A (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154: 367–382.
- 10 Lin R-Y, Shen H-D, Han S-H (1993) Identification and characterization of a 30 kd major allergen from *Parapenaeus fissurus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 837–845.
- Miyamoto T, In: *Advances in Allergology and Clinical Immunology*, Eds Godard P et al., The Parthenon Publishing Group-Carnforth, U. K. and New Jersey, USA, (1992) 343–347.
- Nagao T, Mitamura T, Wang X H, Negoro S, Yomo T, Urabe I, Okada H (1992) Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.* 174: 5013–5020.
- 15 Pearson W R, Lipman D J (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444–2448.
- Reese G, Ayuso R, Lehrer S B (1999) Tropomyosin: an invertebrate panallergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 247–258.
- 20 Rosenstreich D L, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin R G, Gergen P, Mitchell H, McNiff Mortimer K, Lynn H, Ownby D, Malveaux F (1997) The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N. Engl. J. Med.* 336: 1356–1363.
- Schupp J M, Travis S E, Price L B, Shand R F, Keim P (1995) Rapid bacterial permeabilization reagent useful for enzyme assays. *Biotechniques* 19: 18–20.
- 25 Segal D M, Taurog J D, Metzger H (1977) Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2993–2997.
- Short J M, Fernandez J M, Sorge J A, Huse W D (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16: 7583–7600.
- 30 Storms W W, Berry C, Withee W (1981) Miller moth asthma. *Clin. Allergy* 11: 55–59.
- Suzuki M, Itoh H, Sugiyama K, Takagi I, Nishimura J, Kato K, Mamiya S, Baba S, Ohya Y et al. (1995) Causative allergens of allergic rhinitis in Japan with special reference to silkworm moth allergen. *Allergy* 50: 23–27.
- Thomas W R, Smith W (1999) Towards defining the full spectrum of important house dust mite allergens. *Clin. Exp. Allergy* 29: 1583–1587.
- 35 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350–4354.
- Unger A, Stoger P, Simon Nobbe B, Susani M, Cramer R, Ebner C, Hintner H, Breitenbach M (1999) Clinical testing of recombinant allergens of the mold *Alternaria alternata*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 220–221.
- Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557–560.
- 40 Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H (1999) The recombinant-allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin. Exp. Allergy* 29 (1999) 896–904.
- Van Wijnen J H, Verhoeff A P, Mulder Folkerts D K, Brachel H J, Schou C (1997) Cockroach allergen in house dust. *Allergy* 52: 460–464.
- 45 Vrtala S, Sperr W R, Reimitzer I, von Ree R, Laffer S, Muller W D, Valent P, Lechner K, Rumpold H, Kraft D, et al. (1993) cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant Phl pV allergen. *J. Immunol.* 151: 4773–4781.
- Wang X, Zheng S, Zhang H (1994) A study of occupational asthma and specific IgE in sericulture workers. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao.* 16: 323–327
- 50 Wu C H, Lee M F, Liao S C, Luo S F (1996) Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 17937–17943.
- Wyss M, Maughan D, Wallimann T (1995) Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man. *Biochem. J.* 309: 255–261.
- 55
- 60
- 65

DE 100 41 541 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Duchene, Michael		
<120> Rekombinante Allergene aus der Motte Plodia interpunctella		5
<130> 22034pdemd		10
<140>		
<141>		
<160> 8		15
<170> PatentIn Ver. 2.1		20
<210> 1		
<211> 1294		
<212> DNA		25
<213> Plodia interpunctella		
<220>		
<221> CDS		30
<222> (25)..(1089)		
<400> 1		
tcaagtgtca gaaaagcagc agca atg gtg gac gcc gct acc ctt gag aaa	51	35
Met Val Asp Ala Ala Thr Leu Glu Lys		
1 5		
ttg gag gct ggc ttc agc aag ctt gcc gcc tcc gac tca aag tcg ctg	99	40
Leu Glu Ala Gly Phe Ser Lys Leu Ala Ala Ser Asp Ser Lys Ser Leu		
10 15 20 25		
ctg aag aaa tac ctc acc agg gag gta ttt gat gct ctc aag aac aag	147	45
Leu Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Glu Val Phe Asp Ala Leu Lys Asn Lys		
30 35 40		
aag acc tca ttt ggt tca act ctc ctg gat tct atc cag tca ggt gtt	195	50
Lys Thr Ser Phe Gly Ser Thr Leu Leu Asp Ser Ile Gln Ser Gly Val		
45 50 55		55
gag aac tta cat tcg ggt gtt gga att tat gcc cca gat gct gag gca	243	
Glu Asn Leu His Ser Gly Val Gly Ile Tyr Ala Pro Asp Ala Glu Ala		
60 65 70		60
tat gta gta ttt gca gac ttg ttc gac ccc atc att gaa gat tac cac	291	
Tyr Val Val Phe Ala Asp Leu Phe Asp Pro Ile Ile Glu Asp Tyr His		
		65

DE 100 41 541 A 1

270	275	280		
gtg cac atc aag ctg ccc aag ctg gcg gcc gac aag gcc aag ctg gag			915	5
Val His Ile Lys Leu Pro Lys Leu Ala Ala Asp Lys Ala Lys Leu Glu				
285	290	295		
gag gtg gcc agc aag tac cac ctg cag gtg cgc gcc acc cgc gcc gag			963	10
Glu Val Ala Ser Lys Tyr His Leu Gln Val Arg Gly Thr Arg Gly Glu				
300	305	310		
cac acg gag gcc gag gcc gcc gtc tac gac atc tcc aac aag agg cgc			1011	15
His Thr Glu Ala Glu Gly Gly Val Tyr Asp Ile Ser Asn Lys Arg Arg				
315	320	325		
atg gga ctc acc gag tac gaa gcc gtc aag gag atg tac gac gcc atc			1059	20
Met Gly Leu Thr Glu Tyr Glu Ala Val Lys Glu Met Tyr Asp Gly Ile				
330	335	340	345	25
gct gaa ctg atc aaa atc gag aaa tcc ctg taagatgttt aacgatctcg			1109	30
Ala Glu Leu Ile Lys Ile Glu Lys Ser Leu				
350	355			
cgctatcagt attttttgta ttatttatcg ttttcacata agtattggat gtgaaggggc			1169	
gagggcgaca ctagtcagcg gccttgagcg gggccgggca cgcgggcggc ccactatact			1229	35
gtttcgtaaa agtattgtct ataaggaaat ggaaaataaa gacagctagc gttaagacaa			1289	
aaaaa			1294	40
<210> 2				45
<211> 355				
<212> PRT				
<213> Plodia interpunctella				50
<400> 2				
Met Val Asp Ala Ala Thr Leu Glu Lys Leu Glu Ala Gly Phe Ser Lys				
1	5	10	15	55
Leu Ala Ala Ser Asp Ser Lys Ser Leu Leu Lys Lys Tyr Leu Thr Arg				
20	25	30		
Glu Val Phe Asp Ala Leu Lys Asn Lys Lys Thr Ser Phe Gly Ser Thr				60
35	40	45		
Leu Leu Asp Ser Ile Gln Ser Gly Val Glu Asn Leu His Ser Gly Val				65
50	55	60		

DE 100 41 541 A 1

	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Asp	Ala	Glu	Ala	Tyr	Val	Val	Phe	Ala	Asp	Leu
	65					70					75					80
5	Phe	Asp	Pro	Ile	Ile	Glu	Asp	Tyr	His	Asn	Gly	Phe	Lys	Lys	Thr	Asp
				85						90					95	
10	Lys	His	Pro	Pro	Lys	Asn	Trp	Gly	Asp	Val	Glu	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu
				100					105					110		
15	Asp	Pro	Ala	Gly	Glu	Phe	Val	Val	Ser	Thr	Arg	Val	Arg	Cys	Gly	Arg
			115					120					125			
20	Ser	Met	Glu	Gly	Tyr	Pro	Phe	Asn	Pro	Cys	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr
		130					135					140				
25	Lys	Glu	Met	Glu	Glu	Lys	Val	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly
	145					150					155					160
30	Gln	Gln	Gln	Leu	Ile	Asp	Asp	His	Phe	Leu	Phe	Lys	Glu	Gly	Asp	Arg
				180					185					190		
35	Phe	Leu	Gln	Ala	Ala	Asn	Ala	Cys	Arg	Phe	Trp	Pro	Ser	Gly	Arg	Gly
			195					200					205			
40	Ile	Tyr	His	Asn	Glu	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Val	Trp	Cys	Asn	Glu	Glu
		210					215					220				
45	Asp	His	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Met	Gln	Met	Gly	Gly	Asp	Leu	Lys	Gln
	225					230					235					240
50	Val	Tyr	Lys	Arg	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Asn	Asp	Ile	Ala	Lys	Arg	Ile
				245						250					255	
55	Asn	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Val	His	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys
			275					280					285			
60	Leu	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Val	Ala	Ser	Lys	Tyr	His
		290					295					300				
65	Leu	Gln	Val	Arg	Gly	Thr	Arg	Gly	Glu	His	Thr	Glu	Ala	Glu	Gly	Gly
	305					310					315					320

DE 100 41 541 A 1

	90	95	100		
5	cgc ctc gcc acc gcc aca gcc aaa ctg tcc gaa gcc agc cag gct gcc			390	
	Arg Leu Ala Thr Ala Thr Ala Lys Leu Ser Glu Ala Ser Gln Ala Ala				
	105	110	115	120	
10	gat gag tcg gaa cgt gcc cgc aag gtg ctc gag aac agg tca ttg gct			438	
	Asp Glu Ser Glu Arg Ala Arg Lys Val Leu Glu Asn Arg Ser Leu Ala				
		125	130	135	
15	gat gaa gag cgt atg gac gct ttg gag aac cag ctg aag gaa gcc agg			486	
	Asp Glu Glu Arg Met Asp Ala Leu Glu Asn Gln Leu Lys Glu Ala Arg				
		140	145	150	
20	ttc ctt gct gag gaa gcc gac aag aaa tac gat gag gtt gct cgt aag			534	
	Phe Leu Ala Glu Glu Ala Asp Lys Lys Tyr Asp Glu Val Ala Arg Lys				
		155	160	165	
25	ctg gcc atg gtt gag gct gac ctg gag cgc gcg gag gag cgt gcc gaa			582	
	Leu Ala Met Val Glu Ala Asp Leu Glu Arg Ala Glu Glu Arg Ala Glu				
30		170	175	180	
	tcc ggc gaa tcc aaa atc gtc gag ctt gag gaa gaa ctg cgc gtg gtt			630	
	Ser Gly Glu Ser Lys Ile Val Glu Leu Glu Glu Glu Leu Arg Val Val				
35		185	190	195	200
	ggc aac aac ttg aaa tcc ctg gaa gtc tcc gag gag aag gcc aac caa			678	
	Gly Asn Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Ser Glu Glu Lys Ala Asn Gln				
40		205	210	215	
	cgt gag gag gag tac aaa aat cag atc aaa acc ctc acc acc cgc cta			726	
	Arg Glu Glu Glu Tyr Lys Asn Gln Ile Lys Thr Leu Thr Thr Arg Leu				
45		220	225	230	
	aag gag gct gag gcc cgc gct gag ttc gcc gag cgt tcc gtg cag aaa			774	
	Lys Glu Ala Glu Ala Arg Ala Glu Phe Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys				
50		235	240	245	
	ctg caa aag gag gtc gac agg ctt gaa gac gaa ctg gtg gct gag aag			822	
	Leu Gln Lys Glu Val Asp Arg Leu Glu Asp Glu Leu Val Ala Glu Lys				
55		250	255	260	
	gag aaa tac aaa gat att ggt gac gac ctg gac acc ccc ttc gtc gag			870	
	Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Gly Asp Asp Leu Asp Thr Pro Phe Val Glu				
60		265	270	275	280
	ctc atc ctc aag gaa taaactcctc acgttggtca cctgggctg tcccatgctg			925	
	Leu Ile Leu Lys Glu				

DE 100 41 541 A 1

285

```

ggcagaccca cgggtcattc caagacgcgg ctcttccgcc agcgattcaa catctgtaca 985      5
gatgttatat tcattttata ctattttaa atatttaa atatagtttt atggcgggtat 1045
ttattttcga gtaatataat aaataattta ttacttattt aaaaaaa                1092    10

<210> 4
<211> 285
<212> PRT
<213> Plodia interpunctella

<400> 4
Met Asp Ala Ile Lys Lys Lys Met Gln Ala Met Lys Leu Glu Lys Asp
  1                5                10                15
Asn Ala Leu Asp Arg Ala Ala Met Cys Glu Gln Gln Ala Lys Asp Ala
      20                25                30
Asn Leu Arg Ala Glu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Arg Gln Leu Gln Lys
      35                40                45
Lys Ile Gln Thr Ile Glu Asn Asp Leu Asp Gln Thr Gln Glu Ala Leu
      50                55                60
Met Gln Val Asn Ala Lys Leu Glu Glu Lys Glu Lys Ala Leu Gln Asn
      65                70                75                80
Ala Glu Ser Glu Val Ala Ala Leu Asn Arg Arg Ile Gln Leu Leu Glu
      85                90                95
Glu Asp Leu Glu Arg Ser Glu Glu Arg Leu Ala Thr Ala Thr Ala Lys
      100               105               110
Leu Ser Glu Ala Ser Gln Ala Ala Asp Glu Ser Glu Arg Ala Arg Lys
      115               120               125
Val Leu Glu Asn Arg Ser Leu Ala Asp Glu Glu Arg Met Asp Ala Leu
      130               135               140
Glu Asn Gln Leu Lys Glu Ala Arg Phe Leu Ala Glu Glu Ala Asp Lys
      145               150               155               160
Lys Tyr Asp Glu Val Ala Arg Lys Leu Ala Met Val Glu Ala Asp Leu
      165               170               175

```

DE 100 41 541 A 1

```

Glu Arg Ala Glu Glu Arg Ala Glu Ser Gly Glu Ser Lys Ile Val Glu
      180                      185                      190

5  Leu Glu Glu Glu Leu Arg Val Val Gly Asn Asn Leu Lys Ser Leu Glu
      195                      200                      205

10 Val Ser Glu Glu Lys Ala Asn Gln Arg Glu Glu Glu Tyr Lys Asn Gln
      210                      215                      220

      Ile Lys Thr Leu Thr Thr Arg Leu Lys Glu Ala Glu Ala Arg Ala Glu
15  225                      230                      235                      240

      Phe Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys Leu Gln Lys Glu Val Asp Arg Leu
20  245                      250                      255

      Glu Asp Glu Leu Val Ala Glu Lys Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Gly Asp
25  260                      265                      270

30  Asp Leu Asp Thr Pro Phe Val Glu Leu Ile Leu Lys Glu
      275                      280                      285

35  <210> 5
      <211> 2230
      <212> DNA
      <213> Plodia interpunctella

40  <220>
      <221> CDS
      <222> (13)..(2127)

45  <400> 5
      ggtgggtgga cg atg aag act gtc ctg atc tta gct ggc ctc gtg gcc ctg 51
      Met Lys Thr Val Leu Ile Leu Ala Gly Leu Val Ala Leu
      1                      5                      10

50  gcc gcg ggc aac acc ttc ccg gta ttc aga tat gac cac gtc gaa act 99
      Ala Ala Gly Asn Thr Phe Pro Val Phe Arg Tyr Asp His Val Glu Thr
      15                      20                      25

55  aga aaa ttg gaa gga gac ctt tta cag tac cag tcg aaa ttt ctg tct 147
      Arg Lys Leu Glu Gly Asp Leu Leu Gln Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Ser
      30                      35                      40                      45

60  ctt ctt gag aat gtg aga cag att gac tac gaa gcg gag tac tac aaa 195
      Leu Leu Glu Asn Val Arg Gln Ile Asp Tyr Glu Ala Glu Tyr Tyr Lys
      50                      55                      60

```


DE 100 41 541 A 1

```

gag gac ttt att ggt atc ttc aag gaa cgc cgt gga gaa ttc tac tac      819
Glu Asp Phe Ile Gly Ile Phe Lys Glu Arg Arg Gly Glu Phe Tyr Tyr
      255                , 260                265

5
tac ttc tat cag caa ctc ttg tct cgt tac tac ctt gag cgt ttg agt      867
Tyr Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Arg Tyr Tyr Leu Glu Arg Leu Ser
10 270                275                280                285

aat ggc ttg gga gaa att cca gat ttc tct tgg tac caa cct ctg agg      915
Asn Gly Leu Gly Glu Ile Pro Asp Phe Ser Trp Tyr Gln Pro Leu Arg
15                290                295                300

agt ggt tac tat cca gct ata tat acg agc tca gcc tat ccg ttt gct      963
Ser Gly Tyr Tyr Pro Ala Ile Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Pro Phe Ala
20                305                310                315

caa cgt ccc aac tat tat tac atg gga act gaa gaa aat gtt gac tac      1011
Gln Arg Pro Asn Tyr Tyr Tyr Met Gly Thr Glu Glu Asn Val Asp Tyr
25                320                325                330

atc caa ttc ctt gat gct cag gaa aag agc ttt gtg caa ttt ctg cag      1059
Ile Gln Phe Leu Asp Ala Gln Glu Lys Ser Phe Val Gln Phe Leu Gln
30                335                340                345

att ggc cag ttt aag gca ttt aaa caa gat gta gac ttc cgc aac tcc      1107
Ile Gly Gln Phe Lys Ala Phe Lys Gln Asp Val Asp Phe Arg Asn Ser
35                355                360                365

aag tca ata aac ttt gtt ggc aac ttt tgg caa gga aac ccg gac ctg      1155
Lys Ser Ile Asn Phe Val Gly Asn Phe Trp Gln Gly Asn Pro Asp Leu
40                370                375                380

tac gat aag tac gga agg gaa gta aac tat gac gac tcc tac gaa atc      1203
Tyr Asp Lys Tyr Gly Arg Glu Val Asn Tyr Asp Asp Ser Tyr Glu Ile
45                385                390                395

atc gct cgc cgc gtg ctt ggt gct gct cct ccg acc tcc gac aat tac      1251
Ile Ala Arg Arg Val Leu Gly Ala Ala Pro Pro Thr Ser Asp Asn Tyr
50                400                405                410

gaa ttc gtg ccg tct gct ctg gac ttc tac cag act tca ctt cgt gat      1299
Glu Phe Val Pro Ser Ala Leu Asp Phe Tyr Gln Thr Ser Leu Arg Asp
55                415                420                425

ccc gcc ttc tac atg ctc tat aac aag atc atg agc tac att gta cag      1347
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Met Ser Tyr Ile Val Gln
60                430                435                440                445

65

```


DE 100 41 541 A 1

```

gct ctc agc aaa gac cta gag gct atg aag aat atc atc ctt gac aac 1971
Ala Leu Ser Lys Asp Leu Glu Ala Met Lys Asn Ile Ile Leu Asp Asn
5         640                 645                 650

aaa cct ttg ggc tat cca ttt gac cgt cct gtc gag tac ccg tat ctc 2019
Lys Pro Leu Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Val Glu Tyr Pro Tyr Leu
10        655                 660                 665

ttc tta caa cct aat atg tac ttt gaa gac gtc aat atc tac cac aga 2067
Phe Leu Gln Pro Asn Met Tyr Phe Glu Asp Val Asn Ile Tyr His Arg
15        670                 675                 680                 685

ggc cct caa tac ccc tgg tgg agt aat ggc caa ttc cgt ctg aat gaa 2115
Gly Pro Gln Tyr Pro Trp Trp Ser Asn Gly Gln Phe Arg Leu Asn Glu
20        690                 695                 700

gta cct aga caa taaaggagag agaaagagtt cttgaaccaa aacatttaaa 2167
25 Val Pro Arg Gln
        705

gctagtagaa cactatagtc acaataaaat aaaaattttt atagtaaaaa aaaaaaaaaa 2227
30

aaa 2230

35 <210> 6
    <211> 705
    <212> PRT
40 <213> Plodia interpunctella

<400> 6
Met Lys Thr Val Leu Ile Leu Ala Gly Leu Val Ala Leu Ala Ala Gly
45   1             5             10             15

Asn Thr Phe Pro Val Phe Arg Tyr Asp His Val Glu Thr Arg Lys Leu
50             20             25             30

Glu Gly Asp Leu Leu Gln Tyr Gln Ser Lys Phe Leu Ser Leu Leu Glu
35             40             45

55 Asn Val Arg Gln Ile Asp Tyr Glu Ala Glu Tyr Tyr Lys Val Gly Lys
    50             55             60

60 Gly Tyr Asp Ile Val Ala Ser Ile Glu Asn Tyr Ser Asp Gln Asp Ala
    65             70             75             80

65 Val Arg Ala Phe Ala Gly Leu Arg Glu Ile Gly Phe Met Pro Lys Ala

```

DE 100 41 541 A 1

	85		90		95	
Tyr Thr Phe Ser Ile Phe Tyr Asp Arg Gln Arg Glu Glu Ala Lys Ile	100		105		110	5
Ile Tyr Asp Leu Phe Tyr Ser Ala Lys Asp Leu Asp Thr Phe Tyr Lys	115		120		125	10
Thr Val Ala Tyr Gly Arg Ile Tyr Phe Asn Glu Tyr Gln Phe Met Tyr	130		135		140	15
Ala Phe Tyr Ala Ala Ile Ile Gln Arg Ser Asp Thr Thr Gly Ile Val	145		150		155	20
Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Leu Tyr Pro Glu Tyr Phe Leu Asn Met Tyr	165		170		175	25
Thr Ile Gln Arg Met Tyr Arg Thr Gln Met Gln Ser Gly Ile Phe Asn	180		185		190	30
Glu Glu Val Ala Ser Asn Tyr Gly Ile Trp Lys Met Asp Asn Asn Tyr	195		200		205	35
Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Tyr Arg Asn Gln Glu	210		215		220	40
Tyr Arg Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Asp Ile Gly Trp Asn Ser Tyr Tyr	225		230		235	45
Tyr Tyr Phe His Asn Leu Met Pro Phe Trp Gly Lys Gly Glu Asp Phe	245		250		255	50
Ile Gly Ile Phe Lys Glu Arg Arg Gly Glu Phe Tyr Tyr Tyr Phe Tyr	260		265		270	55
Gln Gln Leu Leu Ser Arg Tyr Tyr Leu Glu Arg Leu Ser Asn Gly Leu	275		280		285	60
Gly Glu Ile Pro Asp Phe Ser Trp Tyr Gln Pro Leu Arg Ser Gly Tyr	290		295		300	65
Tyr Pro Ala Ile Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Pro Phe Ala Gln Arg Pro	305		310		315	70
Asn Tyr Tyr Tyr Met Gly Thr Glu Glu Asn Val Asp Tyr Ile Gln Phe	325		330		335	75
Leu Asp Ala Gln Glu Lys Ser Phe Val Gln Phe Leu Gln Ile Gly Gln						80

DE 100 41 541 A 1

	340	345	350
5	Phe Lys Ala Phe Lys Gln Asp Val Asp Phe Arg Asn Ser Lys Ser Ile 355	360	365
10	Asn Phe Val Gly Asn Phe Trp Gln Gly Asn Pro Asp Leu Tyr Asp Lys 370	375	380
15	Tyr Gly Arg Glu Val Asn Tyr Asp Asp Ser Tyr Glu Ile Ile Ala Arg 385	390	395
20	Arg Val Leu Gly Ala Ala Pro Pro Thr Ser Asp Asn Tyr Glu Phe Val 405	410	415
25	Pro Ser Ala Leu Asp Phe Tyr Gln Thr Ser Leu Arg Asp Pro Ala Phe 420	425	430
30	Tyr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Met Ser Tyr Ile Val Gln Tyr Lys Glu 435	440	445
35	Trp Leu Glu Pro Tyr Asp Gln Glu Val Leu His Tyr Ser Gly Val Lys 450	455	460
40	Ile Asn Asp Val Ser Val Gly Asn Leu Thr Thr Phe Phe Glu Tyr Tyr 465	470	475
45	Asp Phe Asn Ala Thr Asn Ala Val Phe Leu Ser Asp Gln Glu Ile Gln 485	490	495
50	Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Ile Val Arg Gln Pro Arg Leu Asn His Glu 500	505	510
55	Pro Phe Ser Val Thr Ile Asp Val Lys Ser Asp Val Glu Ala Glu Ala 515	520	525
60	Tyr Phe Lys Ile Phe Val Gly Pro Lys Tyr Asp Gly Glu Gly Arg Pro 530	535	540
65	Leu Ser Leu Glu Asp Asn Trp Met Asn Phe Val Glu Leu Asp Trp Phe 545	550	555
70	Thr His Lys Leu Thr Ser Gly Gln Asn Lys Val Glu Arg Lys Ser Glu 565	570	575
75	Glu Phe Phe Phe Phe Lys Glu Asp Ser Val Ser Met Ser Lys Ile Tyr 580	585	590
80	Glu Leu Leu Lys Gln Gly Gln Val Pro Glu Ser Met Ser Glu Asp Tyr		

DE 100 41 541 A 1

595	600	605		
Asp Ser Met Pro Ser Arg Leu Met Leu Pro Arg Gly Thr Pro Gly Gly 610	615	620		5
Phe Pro Val Gln Phe Phe Val Phe Val Tyr Pro Tyr Gln Ala Leu Ser 625	630	635		10
Lys Asp Leu Glu Ala Met Lys Asn Ile Ile Leu Asp Asn Lys Pro Leu 645	650	655		15
Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Val Glu Tyr Pro Tyr Leu Phe Leu Gln 660	665	670		20
Pro Asn Met Tyr Phe Glu Asp Val Asn Ile Tyr His Arg Gly Pro Gln 675	680	685		25
Tyr Pro Trp Trp Ser Asn Gly Gln Phe Arg Leu Asn Glu Val Pro Arg 690	695	700		30
Gln 705				35
<210> 7				40
<211> 1076				
<212> DNA				
<213> Plodia interpunctella				45
<220>				
<221> CDS				
<222> (73)..(834)				50
<400> 7				
taactggtat tgctcagtga taatagatta gttattatat tgtcaagaag ctgatacggt 60				55
tgcaaaatca tc atg aat ttc gcc ggt aaa gtt gta att gta acc ggt gct 111 Met Asn Phe Ala Gly Lys Val Val Ile Val Thr Gly Ala 1 5 10				60
agc tcc ggt att gga gca gct aca gct gtg ttc cta tcg aaa cta ggc 159 Ser Ser Gly Ile Gly Ala Ala Thr Ala Val Phe Leu Ser Lys Leu Gly 15 20 25				65
gct aag ctt tct ctg acg gga cgt aac gtc gag aat ctt aag aaa gtt 207 Ala Lys Leu Ser Leu Thr Gly Arg Asn Val Glu Asn Leu Lys Lys Val 30 35 40 45				70

DE 100 41 541 A 1

agt cag gat tgc gaa aaa tcc acc cag aca cac tac atc gcc gcc gac 255
 Ser Gln Asp Cys Glu Lys Ser Thr Gln Thr His Tyr Ile Ala Ala Asp
 5 50 55 60

tta acc aaa gaa aaa gat att gaa aat atc gtt aaa agc acc att gat 303
 Leu Thr Lys Glu Lys Asp Ile Glu Asn Ile Val Lys Ser Thr Ile Asp
 10 65 70 75

aaa tac ggc caa ctt gac gtc ctg gtc aat aat gct ggc att ctt gag 351
 Lys Tyr Gly Gln Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Leu Glu
 15 80 85 90

act ggt tcc atc gaa aac aca tcg tta gcc cag tac gac agg tta atg 399
 Thr Gly Ser Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Arg Leu Met
 20 95 100 105

aat aca aat gtg cgc tca att tat tac tta acc atg ctg gca gtc cca 447
 Asn Thr Asn Val Arg Ser Ile Tyr Tyr Leu Thr Met Leu Ala Val Pro
 25 110 115 120 125

cac ctt ctc aaa acc aaa ggt aac att gtg aat gta tct agt gtc aat 495
 His Leu Leu Lys Thr Lys Gly Asn Ile Val Asn Val Ser Ser Val Asn
 30 130 135 140

ggg atc agg tct ttc cct ggt gta ctg gct tac aat gtt tcg aag tca 543
 Gly Ile Arg Ser Phe Pro Gly Val Leu Ala Tyr Asn Val Ser Lys Ser
 35 145 150 155

gct gta gat cag ttt aca aga tgt gtt gca ctt gaa ttg gcc ccg aaa 591
 Ala Val Asp Gln Phe Thr Arg Cys Val Ala Leu Glu Leu Ala Pro Lys
 40 160 165 170

ggg gta cga gtt aat tgt gtg aat cca gga gtc att ttg aca gaa ctg 639
 Gly Val Arg Val Asn Cys Val Asn Pro Gly Val Ile Leu Thr Glu Leu
 45 175 180 185

cag aag cgt ggg ggt ttg aac gac cag cag tat gca gca ttt ctg gag 687
 Gln Lys Arg Gly Gly Leu Asn Asp Gln Gln Tyr Ala Ala Phe Leu Glu
 50 190 195 200 205

aga acc aag gag aca cat gcc ttg ggc cgg ccg gga aaa ccg gag gag 735
 Arg Thr Lys Glu Thr His Ala Leu Gly Arg Pro Gly Lys Pro Glu Glu
 55 210 215 220

gtt gca gct act att gct ttc ttg gcc agt gaa tta gca agc aat atc 783
 Val Ala Ala Thr Ile Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Ala Ser Asn Ile
 60 225 230 235

65

DE 100 41 541 A 1

```

act gga gcc agt gtg cct gta gac ggt ggt cgc cat gcc atg tgt cca 831
Thr Gly Ala Ser Val Pro Val Asp Gly Gly Arg His Ala Met Cys Pro
      240                245                250
                                                    5

cga taattttttt aataaaatac atgttaattt tttttttact atttacaatt 884
Arg
                                                    10

tttcaatcca agcatttttac aatgatcaaa gtgtctaaaa ccttttgaat attgtacaat 944
                                                    15

aaaatttttta tatattatag attaagtaaa aacgttcata tacctataat ttgtgtcata 1004
                                                    15

tggatgtcca tgtgttcata tatttttgta taaccttggt attttaaaat aaaaacaaat 1064
                                                    20

aataaaaaaaaa aa 1076
                                                    20

<210> 8
<211> 254 25
<212> PRT
<213> Plodia interpunctella

<400> 8 30
Met Asn Phe Ala Gly Lys Val Val Ile Val Thr Gly Ala Ser Ser Gly
  1                5                10                15

Ile Gly Ala Ala Thr Ala Val Phe Leu Ser Lys Leu Gly Ala Lys Leu 35
      20                25                30

Ser Leu Thr Gly Arg Asn Val Glu Asn Leu Lys Lys Val Ser Gln Asp 40
      35                40                45

Cys Glu Lys Ser Thr Gln Thr His Tyr Ile Ala Ala Asp Leu Thr Lys 45
      50                55                60

Glu Lys Asp Ile Glu Asn Ile Val Lys Ser Thr Ile Asp Lys Tyr Gly 50
      65                70                75                80

Gln Leu Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Leu Glu Thr Gly Ser 55
      85                90                95

Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Arg Leu Met Asn Thr Asn 55
      100                105                110

Val Arg Ser Ile Tyr Tyr Leu Thr Met Leu Ala Val Pro His Leu Leu 60
      115                120                125

Lys Thr Lys Gly Asn Ile Val Asn Val Ser Ser Val Asn Gly Ile Arg 65

```


DE 100 41 541 A 1

	130		135		140
5	Ser Phe Pro Gly Val Leu Ala Tyr Asn Val Ser Lys Ser Ala Val Asp				
	145		150		155 160
10	Gln Phe Thr Arg Cys Val Ala Leu Glu Leu Ala Pro Lys Gly Val Arg				
		165		170	175
15	Val Asn Cys Val Asn Pro Gly Val Ile Leu Thr Glu Leu Gln Lys Arg				
		180		185	190
20	Gly Gly Leu Asn Asp Gln Gln Tyr Ala Ala Phe Leu Glu Arg Thr Lys				
		195		200	205
25	Glu Thr His Ala Leu Gly Arg Pro Gly Lys Pro Glu Glu Val Ala Ala				
		210		215	220
30	Thr Ile Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Ala Ser Asn Ile Thr Gly Ala				
	225		230		235 240
35	Ser Val Pro Val Asp Gly Gly Arg His Ala Met Cys Pro Arg				
		245		250	

Patentansprüche

- 35 1. Nukleinsäure, kodierend für ein allergenes Polypeptid, umfassend
- (a) eine der in SEQ ID No. 1, 3, 5 oder 7 dargestellten Sequenzen oder ein Fragment davon, welches für eine allergene Determinante davon kodiert,
 - (b) eine von einer Sequenz gemäß (a) auf Grund der Degeneration des genetischen Codes abweichende Sequenz,
 - (c) eine Sequenz mit einer Identität > 80% zu einer der Sequenzen von (a) oder/und (b) oder
 - (d) eine Sequenz, die mit einer der Sequenzen gemäß (a), (b) oder/und (c) unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- 40 2. Nukleinsäure, umfassend einen Bereich, der für ein Polypeptid mit einer SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 dargestellten Sequenz kodiert.
- 45 3. Rekombinantes DNA-Molekül, das (a) eine Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenizität der Allergene p40 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 2, p33 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 4, p84 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 6 oder p27 mit der Aminosäuresequenz in der SEQ ID No. 8 besitzt und aus Arthropoden abgeleitet ist, oder (b) eine Nukleotidsequenz, die mit einer Nukleotidsequenz (a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert, aufweist.
- 50 4. Rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1–3, das eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Polypeptid kodiert, das eine antigene Kreuzreaktivität und eine Identität > 50% mit dem p40 Allergen, dem p33 Allergen, dem p84 Allergen oder dem p27 Allergen oder ihren Homologen aus anderen Arthropoden besitzt.
- 55 5. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1–4 in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz.
- 60 6. Rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, die eine Expressionskontrollsequenz besitzen, die operativ mit einem rekombinanten Molekül wie in Anspruch 3 oder 4 beschrieben, verknüpft ist.
7. Rekombinanter Expressionsvektor, der eine Expressionskontrollsequenz besitzt, die funktionell mit einer Nukleotidsequenz verknüpft ist, die unter stringenten Bedingungen mit einer Nukleotidsequenz hybridisiert, wie sie in SEQ ID Nos. 1, 3, 5 oder 7 angegeben ist.
8. Zelle, transformiert mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1–4 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 5–7.
9. Allergenes Polypeptid, kodiert durch eine der Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1–4.
- 65 10. Polypeptid nach Anspruch 9 mit einer in SEQ ID No. 2, 4, 6, oder 8 dargestellten Aminosäuresequenz oder allergene Fragmente davon.
11. Polypeptid, das mit einem Polypeptid nach Anspruch 9 oder 10, insbesondere mit einem Polypeptid der SEQ ID No. 2, 4, 6 oder 8 immunologisch kreuzreaktiv ist.
12. Polypeptid nach einem der Ansprüche 9–11, dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem heterologen Peptid

oder Polypeptid fusioniert ist.

13. Ein Polypeptid nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das heterologe Peptid oder Polypeptid eine zellulosebindende Domäne, β -Galaktosidase oder Glutathion S-Transferase ist.
14. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 9–13 oder von Fragmenten eines solchen Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern. 5
15. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9–13.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
- (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1–4,
 - (b) einen rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 5–7,
 - (c) eine Zelle nach Anspruch 8, 10
 - (d) ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9–13 oder/und
 - (e) einen Antikörper nach Anspruch 15.
17. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 16 zur Herstellung eines diagnostischen und/oder therapeutischen Mittels.
18. Verwendung nach Anspruch 17 für die Therapie oder/und Diagnose von allergischen Erkrankungen. 15
19. Verfahren zur Diagnose, bevorzugt in vitro, einer Allergie gegen Arthropodenproteine, wobei man eine Probe einer Körperflüssigkeit aus dem Patienten, in der Antikörper gegen das Arthropodenprotein vermutet werden, mit einem Polypeptid nach Anspruch 6–13 unter Bedingungen in Kontakt bringt, die die Bildung eines Komplexes zwischen dem Antikörper und dem Polypeptid ermöglichen, wonach der Komplex gemessen wird und zu der Menge des Antikörpers in der Probe in Beziehung gesetzt wird, wobei ein erhöhter Spiegel als Zeichen einer Allergie gegen das Arthropodenprotein gewertet wird, die das Polypeptid enthält. 20
20. Verfahren zur Messung, vorzugsweise in vitro, einer zellulären Immunreaktion, wobei ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 9–13 zur Stimulation der zellulären Immunreaktion verwendet wird.
21. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Argininkinaseaktivität (EC 2.7.3.3) in den Proben bestimmt. 25
22. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein einer Nukleinsäure nach Anspruch 1–4 oder eines allergene Polypeptids nach Anspruch 9–13 bestimmt.
23. Verfahren zur Bestimmung von Arthropodenallergenen in Proben aus der Umwelt des Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein der Allergene p40, p33, p84 oder p27 oder ihrer Homologen bestimmt. 30
24. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man das Vorhandensein eines p40 Homologen aus Milbe oder Motte bestimmt.
25. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das ein synthetisches oder rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 9–13 enthält und zur Hyposensibilisierung (Immuntherapie) von Patienten mit Allergie gegen p40, p33, p84 oder p27 oder ihrer Homologen eingesetzt werden kann. 35
26. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für die passive oder aktive Immuntherapie, das solche Fragmente oder Teilpeptide des Polypeptids der Erfindung enthält, die zwar ein Epitop oder mehrere Epitope, insbesondere IgE, IgG oder IgA-Epitope, des p40, des p33, des p84, oder des p27 Allergens oder ihrer Homologen umfassen, aber nicht oder nur in einem stark eingeschränkten Maß zu einer anaphylaktischen Reaktion führen können. 40
27. Verwendung einer Argininkinase zur Herstellung eines Arzneimittels oder/und eines diagnostischen Mittels zur Behandlung von allergischen Erkrankungen oder/und zur Bestimmung von Allergenen.
28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass eine Argininkinase aus einer Motte oder aus einer Milbe verwendet oder bestimmt wird.
29. Verfahren zum Nachweis einer Allergie, bei dem die Dörrobstmotte, Extrakte davon oder einzelne Bestandteile davon zur Bestimmung der Allergie eingesetzt werden. 45
30. Allergen, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Argininkinase handelt.
31. Allergen nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Argininkinase aus einer Motte oder einer Milbe handelt. 50

Hierzu 11 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

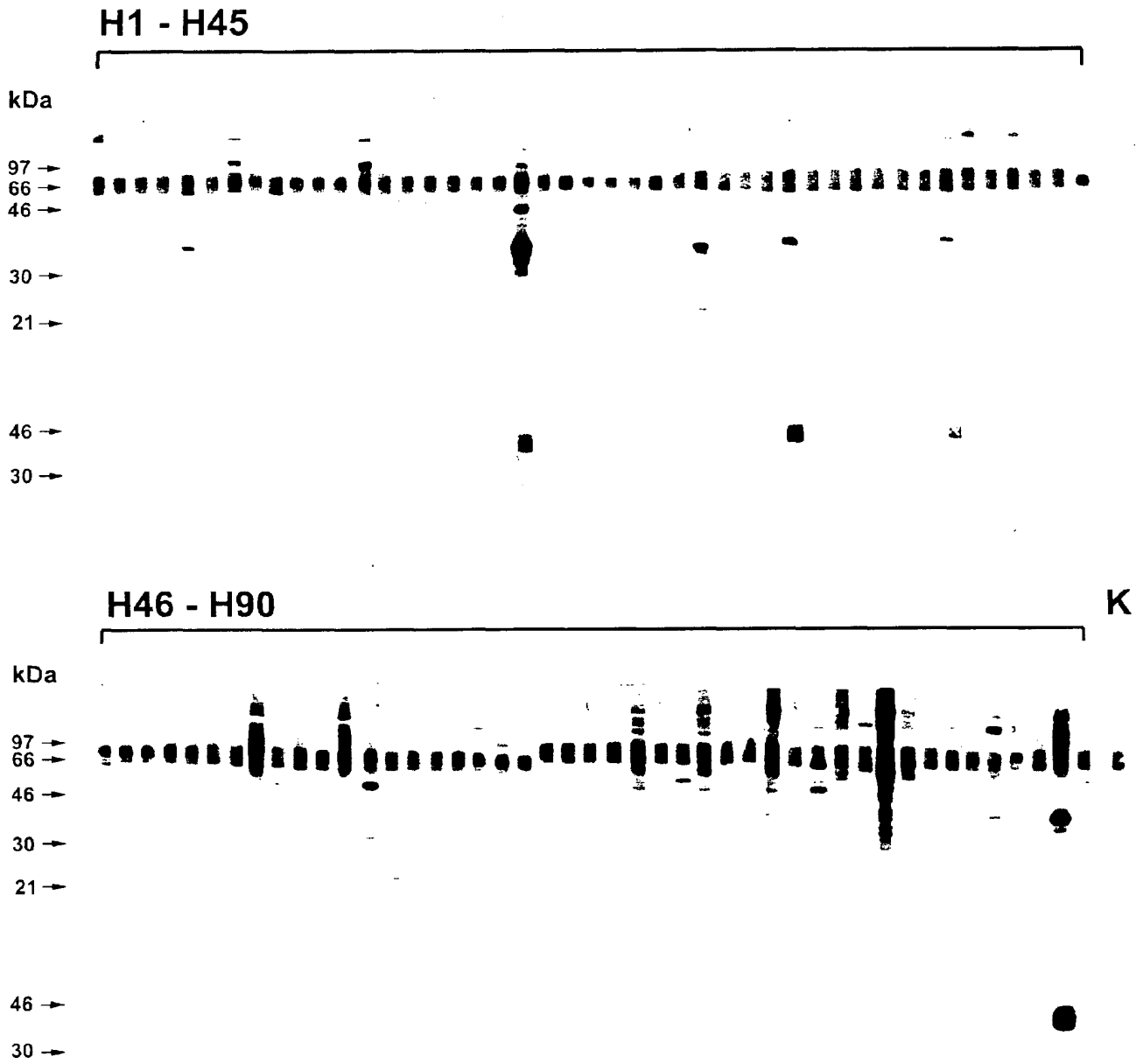


Fig. 1

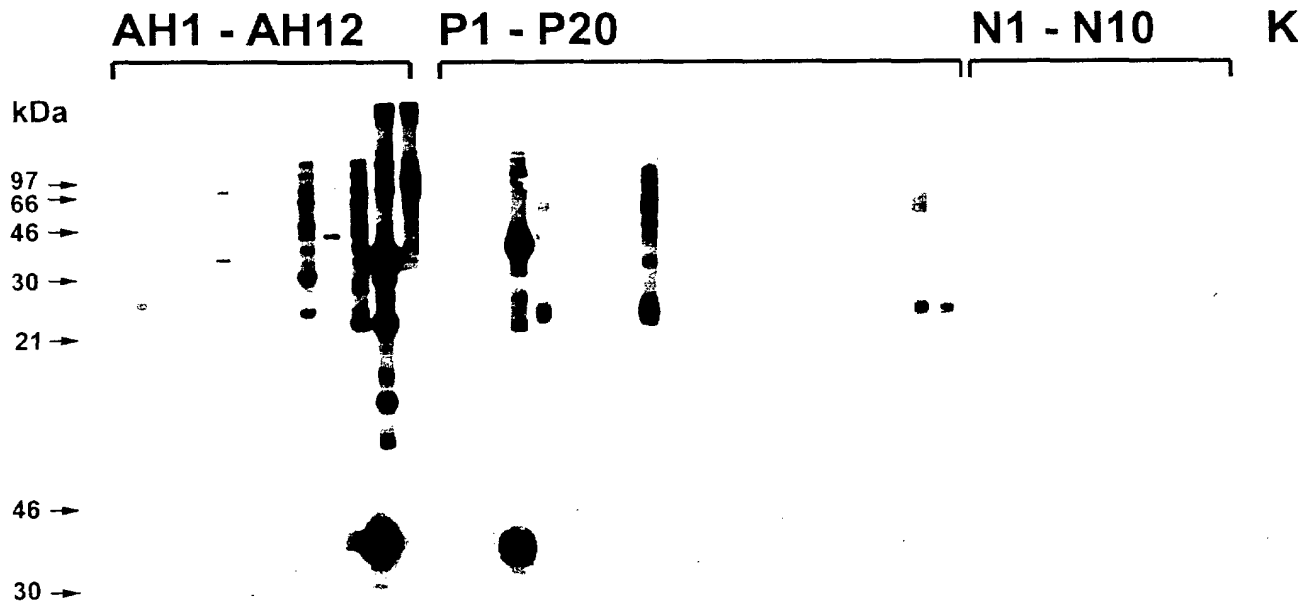


Fig. 2

Fig. 3

1 TCAAGTGTTCAGAAAAGCAGCAGCA
25 ATGGTGGACGCCGCTACCCTTGAGAAATTGGAGGCTGGCTTCAGCAAGCTTGCCGCTCC
1 M V D A A T L E K L E A G F S K L A A S
85 GACTCAAAGTCGCTGCTGAAGAAATACCTCACCAGGGAGGTATTTGATGCTCTCAAGAAC
21 D S K S L L K K Y L T R E V F D A L K N
145 AAGAAGACCTCATTTGGTTCAACTCTCCTGGATTCTATCCAGTCAGGTGTTGAGAACTTA
41 K K T S F G S T L L D S I Q S G V E N L
205 CATTCGGGTGTTGGAATTTATGCCCCAGATGCTGAGGCATATGTAGTATTTGCAGACTTG
61 H S G V G I Y A P D A E A Y V V F A D L
265 TTCGACCCCATCATTGAAGATTACCACAATGGCTTCAAGAAAACCGACAAGCACCCCTCCC
81 F D P I I E D Y H N G F K K T D K H P P
325 AAGAAGTGGGAGATGTTGAGACCCTCGGGAAGTGGATCCTGCTGGTGAATTTGTTGTC
101 K N W G D V E T L G N L D P A G E F V V
385 TCCACCCGTGTCCGCTGCGGTGCTCCATGGAAGGCTACCCATTCAACCCCTGCTTAACA
121 S T R V R C G R S M E G Y P F N P C L T
445 GAGGCCAATACAAGGAAATGGAAGAGAAAGTCTCCTCCACTCTCCGGCCTCGAGGGT
141 E A Q Y K E M E E K V S S T L S G L E G
505 GAACTGAAAGGCACCTTTTTCCCACTCACAGGCATGTCCAAGGAGACTCAACAACAGTTG
161 E L K G T F F P L T G M S K E T Q Q Q L
565 ATTGATGACCACTTCCTGTTCAGGAGGGTGATCGCTTCCTCCAGGCCGCTAACGCTTGC
181 I D D H F L F K E G D R F L Q A A N A C
625 CGCTTCTGGCCCTCCGGTCCGTGGCATCTACCACAATGAGAACAAGACTTTCTGGTATGG
201 R F W P S G R G I Y H N E N K T F L V W
685 TGCAATGAGGAGGACCACCTCCGTCTGATCTCCATGCAAATGGGCGGCGACCTGAAGCAG
221 C N E E D H L R L I S M Q M G G D L K Q
745 GTGTACAAGAGGCTGGTGAGGGGAGTGAACGACATCGCGAAGAGGATCCCATCTCGCAC
241 V Y K R L V R G V N D I A K R I P F S H
805 AACGAGCGGCTGGGCTTCCTGACTTTCTGCCCCACCAACCTGGGCACAACGGTGC GCGCA
261 N E R L G F L T F C P T N L G T T V R A
865 TCGGTGCACATCAAGCTGCCCAAGCTGGCGGCCGACAAGGCCAAGCTGGAGGAGGTGGCC
281 S V H I K L P K L A A D K A K L E E V A
925 AGCAAGTACCACCTGCAGGTGCGCGCACCCGCGGCGAGCACACGGAGGCCGAGGGCGGG
301 S K Y H L Q V R G T R G E H T E A E G G
985 GTCTACGACATCTCCAACAAGAGGCGCATGGGACTCACCGAGTACGAAGCCGTCAAGGAG
321 V Y D I S N K R R M G L T E Y E A V K E
1045 ATGTACGACGGCATCGCTGAACTGATCAAAAATCGAGAAATCCCTGTAAGATGTTTAAACGA
341 M Y D G I A E L I K I E K S L *
1105 TCTCGCGCTATCAGTATTTTTGTATTATTTATCGTTTTACATAAGTATTGGATGTGAA
1165 GGGGCGAGGGCGACACTAGTCAGCGGCTTGAGCGGGCCGGGCACGCGGGCGGCCACT
1225 ATACTGTTTCGTAAGTATTGTCTATAAGGAAATGGAAAATAAAGACAGCTAGCGTTAA
1285 GACAAAAAAA

Fig. 4

1 ACAGGACAGTAGACACACAAAGCCACCACCATGGACGCGATCAAGAAGAAGATGCAGGCG
 1 M D A I K K K M Q A
 61 ATGAAGCTGGAGAAGGACAACGCTTTGGACCGCGCTGCCATGTGCGAGCAGCAGGCCAAG
 11 M K L E K D N A L D R A A M C E Q Q A K
 121 GACGCCAACCTCCGTGCTGAGAAGGCCGAGGAGGAGGCCAGACAATTGCAGAAGAAGATC
 31 D A N L R A E K A E E E A R Q L Q K K I
 181 CAGACGATTGAGAACGATCTGGACCAGACGCAGGAGGCGCTCATGCAGGTCAACGCCAAG
 51 Q T I E N D L D Q T Q E A L M Q V N A K
 241 CTGGAAGAGAAAGAGAAAGCTCTTCAGAACGCTGAGTCCGAAGTCGCTGCCCTCAACCGA
 71 L E E K E K A L Q N A E S E V A A L N R
 301 CGTATCCAACCTGCTGGAAGAGGACCTCGAGAGGTCCGAGGAGCGCCTCGCCACCGCCACA
 91 R I Q L L E E D L E R S E E R L A T A T
 361 GCCAAACTGTCCGAAGCCAGCCAGGCTGCCGATGAGTCGGAACGTGCCCGCAAGGTGCTC
 111 A K L S E A S Q A A D E S E R A R K V L
 421 GAGAACAGGTCATTGGCTGATGAAGAGCGTATGGACGCTTTGGAGAACCAGCTGAAGGAA
 131 E N R S L A D E E R M D A L E N Q L K E
 481 GCCAGGTTCCCTTGCTGAGGAAGCCGACAAGAAATACGATGAGGTTGCTCGTAAGCTGGCC
 151 A R F L A E E A D K K Y D E V A R K L A
 541 ATGGTTGAGGCTGACCTGGAGCGCGCGGAGGAGCGTGCCGAATCCGGCGAATCCAAAATC
 171 M V E A D L E R A E E R A E S G E S K I
 601 GTCGAGCTTGAGGAAGAACTGCGCGTGGTTGGCAACAACCTGAAATCCCTGGAAGTCTCC
 191 V E L E E E L R V V G N N L K S L E V S
 661 GAGGAGAAGGCCAACCAACGTGAGGAGGAGTACAAAAATCAGATCAAAACCTCACCACC
 211 E E K A N Q R E E E Y K N Q I K T L T T
 721 CGCCTAAAGGAGGCTGAGGCCCGCGCTGAGTTCCGCCGAGCGTTCCTGTCAGAACTGCAA
 231 R L K E A E A R A E F A E R S V Q K L Q
 781 AAGGAGGTCGACAGGCTTGAAGACGAACTGGTGGCTGAGAAGGAGAAATACAAAGATATT
 251 K E V D R L E D E L V A E K E K Y K D I
 841 GGTGACGACCTGGACACCCCCTTCGTCGAGCTCATCCTCAAGGAATAAACTCCTCACGTT
 271 G D D L D T P F V E L I L K E *
 901 GGTACCTGGGCCTGTCCCATGCGGGGAGACCCACGGGTCATTCCAAGACGGGCTCTT
 961 CCGCCAGCGATTCAACATCTGTACAGATGTTATATTCAATTTATACTCATTTAAAATATT
 1021 TAAATCTATAGTTTTATGGCGGTATTTATTTTCGAGTAATATAATAAATAATTTATTACT
 1081 TATTTAAAAAAA

Fig. 5

1 GGTGGGTGGACGATGAAGACTGTCCTGATCTTAGCTGGCCTCGTGGCCCTGGCCGCGGGC
1 M K T V L I L A G L V A L A A G

61 AACACCTTCCCGTATTTCAGATATGACCACGTCGAAACTAGAAAATTGGAAGGAGACCTT
17 N T F P V F R Y D H V E T R K L E G D L

121 TTACAGTACCAGTCGAAATTTCTGTCTCTTCTTGAGAATGTGAGACAGATTGACTACGAA
37 L Q Y Q S K F L S L L E N V R Q I D Y E

181 GCGGAGTACTACAAAGTTGGCAAGGGTTACGACATCGTAGCCAGCATAGAGAACTATTCT
57 A E Y Y K V G K G Y D I V A S I E N Y S

241 GACCAAGATGCAGTCAGGGCGTTTGTCTTTCGAGAAATTGGTTTCATGCCCAAAGCT
77 D Q D A V R A F A G L R E I G F M P K A

301 TACACATTCTCCATTTTCTACGACAGGCAGAGAGAAGAAGCTAAGATTATTTATGACTTG
97 Y T F S I F Y D R Q R E E A K I I Y D L

361 TTCTACAGCGCTAAAGATTTGGACACTTTCTACAAGACTGTAGCCTACGGCCGAATCTAT
117 F Y S A K D L D T F Y K T V A Y G R I Y

421 TTCAACGAGTATCAGTTCATGTATGCTTTCTATGCTGCGATTATTCAGCGCTCTGATACC
137 F N E Y Q F M Y A F Y A A I I Q R S D T

481 ACAGGAATCGTCTTACCAGCTCCATATGAACTGTATCCTGAATATTTCTTGAACATGTAT
157 T G I V L P A P Y E L Y P E Y F L N M Y

541 ACGATCCAAAGAATGTACCGAACACAGATGCAAAGTGGTATATTCAATGAGGAAGTTGCT
177 T I Q R M Y R T Q M Q S G I F N E E V A

601 AGTAACTATGGTATCTGGAAGATGGATAATAACTACTATTATTACTACAACACTCTAAT
197 S N Y G I W K M D N N Y Y Y Y Y N Y S N

661 CCCTTGACGTACAGAAATCAGGAGTACAGATTGTCTTATTTGACAGAAGACATAGGCTGG
217 P L T Y R N Q E Y R L S Y L T E D I G W

721 AACTCTTACTATTACTACTTCCACAATCTTATGCCTTTCTGGGGCAAAGCGGAGACTTT
237 N S Y Y Y Y F H N L M P F W G K G E D F

781 ATTGGTATCTTCAAGGAACGCCGTGGAGAATTCTACTACTACTTCTATCAGCAACTCTTG
257 I G I F K E R R G E F Y Y Y F Y Q Q L L

841 TCTCGTTACTACCTTGAGCGTTTGAGTAATGGCTTGGGAGAAATTCAGATTTCTCTTGG
277 S R Y Y L E R L S N G L G E I P D F S W

901 TACCAACCTCTGAGGAGTGGTTACTATCCAGCTATATATACGAGCTCAGCCTATCCGTTT
297 H Q P L R S G Y Y P A I Y T S S A Y P F

961 GCTCAACGTCCCAACTATTATTACATGGGAACTGAAGAAAATGTTGACTACATCCAATTC
317 A Q R P N Y Y Y M G T E E N V D Y I Q F

1021 CTTGATGCTCAGGAAAAGAGCTTTGTGCAATTTCTGCAGATTGGCCAGTTTAAGGCATTT
337 L D A Q E K S F V Q F L Q I G Q F K A F

1081 AAACAAGATGTAGACTTCCGCAACTCCAAGTCAATAAACTTTGTTGGCAACTTTTGGCAA
357 K Q D V D F R N S K S I N F V G N F W Q

1141 GGAAACCCGGACCTGTACGATAAGTACGGAAAGGGAAGTAAACTATGACGACTCCTACGAA
377 G N P D L Y D K Y G R E V N Y D D S Y E

1201 ATCATCGCTCGCCGCTGCTTGGTGCTGCTCCTCCGACCTCCGACAATTACGAATTCGTT
397 I I A R R V L G A A P P T S D N Y E F V

1261 CCGTCTGCTCTGGACTTCTACCAGACTTCACTTCGTGATCCCGCCTTCTACATGCTCTAT
417 P S A L D F Y Q T S L R D P A F Y M L Y

1321 AACAAAGATCATGAGCTACATTGTACAGTACAAGGAATGGTTGGAGCCCTATGATCAAGAG
437 N K I M S Y I V Q Y K E W L E P Y D Q E

1381 GTACTTCACTACTCCGGTGTCAAGATCAATGACGTCAGTGTGGTAACTTGACTACCTTC
457 V L H Y S G V K I N D V S V G N L T T F

1441 TTCGAGTACTATGACTTCAACGCCACCAATGCAGTTTTCTTAAGTGACCAAGAGATTCAA
477 F E Y Y D F N A T N A V F L S D Q E I Q

1501 CAACAATATTTCTTCATTCATCGTACGTCAACCGCGTTTTGAACCACGAACCTTTCTCCGTG
497 Q Q Y S S F I V R Q P R L N H E P F S V

1561 ACCATCGATGTTAAGTCTGACGTTGAGGCGGAAGCGTACTTCAAGATCTTTGTTGGTCTC
517 T I D V K S D V E A E A Y F K I F V G P

1621 AAATATGATGGAGAAGGTCGCCCTCTTAGCTTGGAAGATAACTGGATGAACTTCGTGGAA
537 K Y D G E G R P L S L E D N W M N F V E

1681 TTGGACTGGTTCACCCACAAATTGACGTCAGGACAGAACAAGGTTGAGCGCAAATCTGAG
557 L D W F T H K L T S G Q N K V E R K S E

1741 GAATTTCTTCTTTAAAGAGGACTCCGTCTCAATGTCTAAGATCTATGAACTCCTGAAA
577 E F F F F K E D S V S M S K I Y E L L K

1801 CAGGGCCAGGTACCTGAAAGCATGTCCGAAGACTACGACTCTATGCCAAGCAGACTGATG
597 Q G Q V P E S M S E D Y D S M P S R L M

1861 TTGCCAGAGGCACTCCGGGTGGTTTTCCCTGTACAGTTCTTCGTCTTCGTGTACCCATAC
617 L P R G T P G G F P V Q F F V F V Y P Y

1921 CAAGCTCTCAGCAAAGACCTAGAGGCTATGAAGAATATCATCCTTGACAACAAACCTTTG
637 Q A L S K D L E A M K N I I L D N K P L

1981 GGCTATCCATTTGACCGTCTGTGAGTACCCGTATCTTCTTACAACCTAATATGTAC
657 G Y P F D R P V E Y P Y L F L Q P N M Y

2041 TTTGAAGACGTCAATATCTACCACAGAGGCCCTCAATACCCCTGGTGGAGTAATGGCCAA
677 F E D V N I Y H R G P Q Y P W W S N G Q

2101 TTCCGTCTGAATGAAGTACCTAGACAATAAAGGAGAGAGAAAGAGTTCTTGAACCAAAAC
697 F R L N E V P R Q *

2161 ATTTAAAGCTAGTAGAACACTATAGTCAATAAAATAAAAATTTTTATAGTAAAAAAA

2221 AAAAAAAAAA

Fig. 6

1 TAACTGTTATTGCTCAGTGATAATAGATTAGTTATTATATTGTCAAGAAGCTGATACGTT
 61 TGCAAAATCATCATGAATTTGCGCCGGTAAAGTTGTAATTGTAACCGGTGCTAGCTCCGGT
 M N F A G K V V I V T G A S S G
 121 ATTGGAGCAGCTACAGCTGTGTTCCATCGAAACTAGGCGCTAAGCTTTCTCTGACGGGA
 17 I G A A T A V F L S K L G A K L S L T G
 181 CGTAACGTCGAGAATCTTAAGAAAGTTAGTCAGGATTGCGAAAAATCCACCCAGACACAC
 37 R N V E N L K K V S Q D C E K S T Q T H
 241 TACATCGCCCGGACTTAACCAAAGAAAAAGATATTGAAAATATCGTTAAAAGCACCATT
 57 Y I A A D L T K E K D I E N I V K S T I
 301 GATAAATACGGCCAACCTTGACGTCCTGGTCAATAATGCTGGCATTCTTGAGACTGGTTCC
 77 D K Y G Q L D V L V N N A G I L E T G S
 361 ATCGAAAACACATCGTTAGCCCGTACGACAGGTTAATGAATACAAATGTGCGCTCAATT
 97 I E N T S L A Q Y D R L M N T N V R S I
 421 TATTACTTAACCATGCTGGCAGTCCCACACCTTCTCAAACCAAAGGTAACATTGTGAAT
 117 Y Y L T M L A V P H L L K T K G N I V N
 481 GTATCTAGTGTCAATGGGATCAGGTCTTCCCTGGTGTACTGGCTTACAATGTTTCGAAG
 137 V S S V N G I R S F P G V L A Y N V S K
 541 TCAGCTGTAGATCAGTTTACAAGATGTGTTGCACTTGAATTGGCCCCGAAAGGGGTACGA
 157 S A V D Q F T R C V A L E L A P K G V R
 601 GTTAATTGTGTGAATCCAGGAGTCATTTGACAGAACTGCAGAAGCGTGGGGGTTTGAAC
 177 V N C V N P G V I L T E L Q K R G G L N
 661 GACCAGCAGTATGCAGCATTCTGGAGAGAACCAAGGAGACACATGCCTTGGGCCGGCCG
 197 D Q Q Y A A F L E R T K E T H A L G R P
 721 GGAAAACCGGAGGAGGTTGAGCTACTATTGCTTTCTTGGCCAGTGAATTAGCAAGCAAT
 217 G K P E E V A A T I A F L A S E L A S N
 781 ATCACTGGAGCCAGTGTGCCTGTAGACGGTGGTCGCCATGCCATGTGTCCACGATAATTT
 237 I T G A S V P V D G G R H A M C P R *
 841 TTTTAATAAAAATACATGTTAATTTTTTTTTTACTATTTACAATTTTTCAATCCAAGCATT
 901 TTACAATGATCAAAGTGTCTAAAACCTTTTGAATATTGTACAATAAAAATTTTTATATATT
 961 ATAGATTAAGTAAAAACGTTTCATATACCTATAATTTGTGTTCATATGGATGTCCATGTGTT
 1021 CATATATTTTGTATAACCTTGTATTTTTAAAATAAAAACAAATAATAAAAAAAAAA

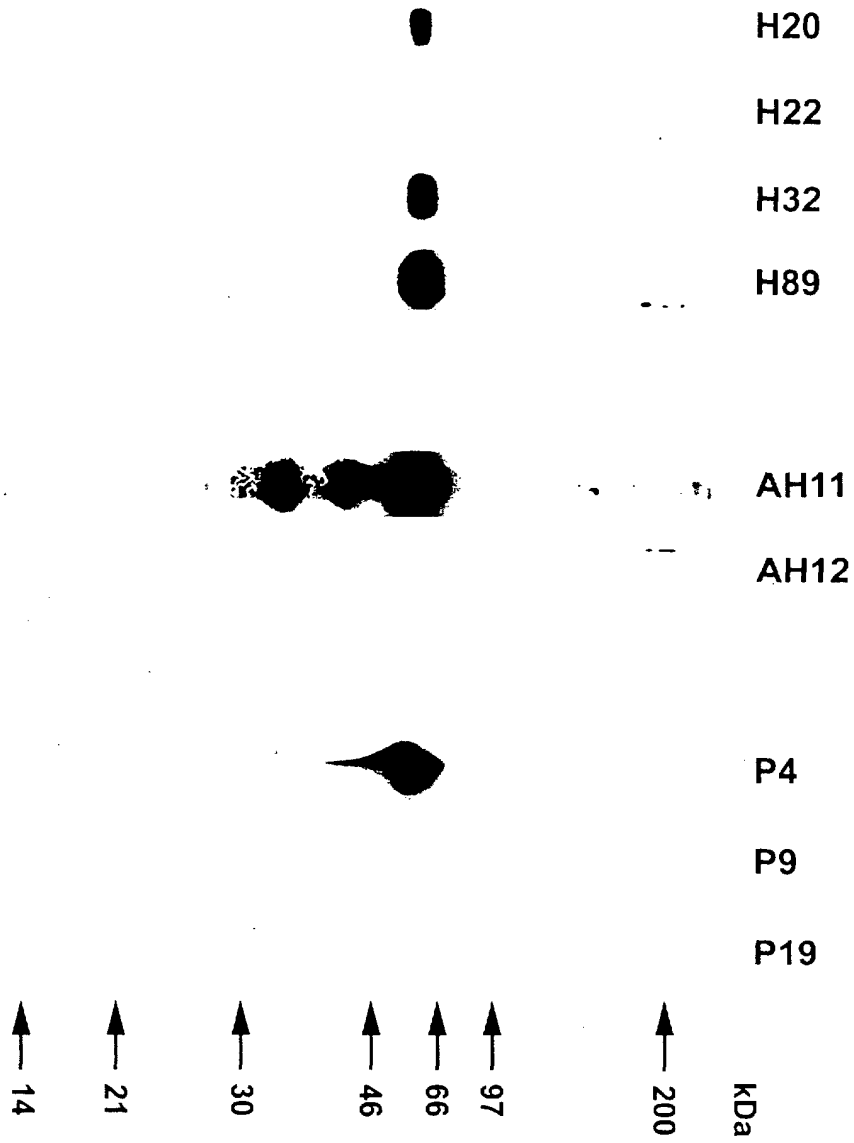


Fig. 7

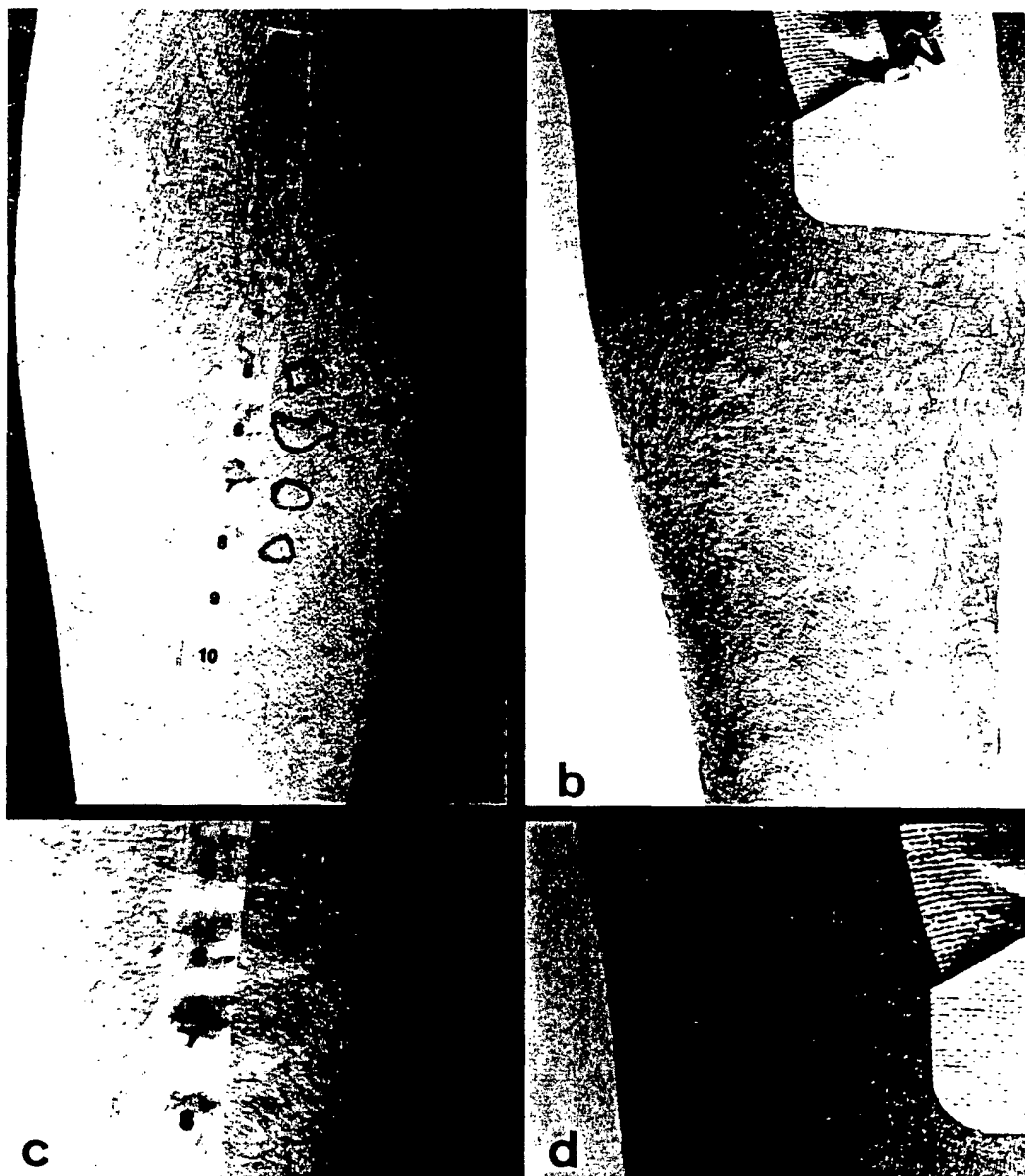


Fig. 8

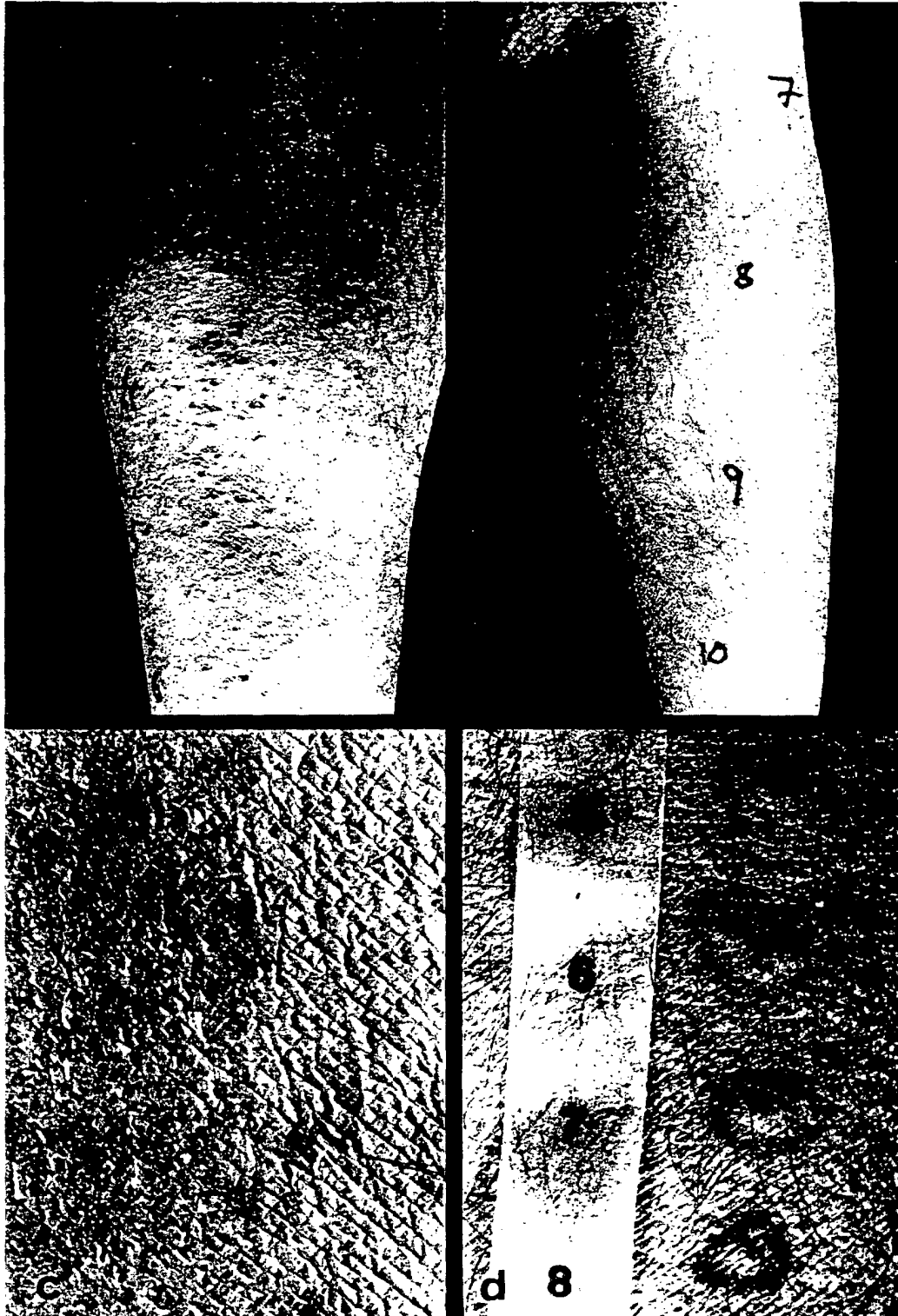


Fig. 9

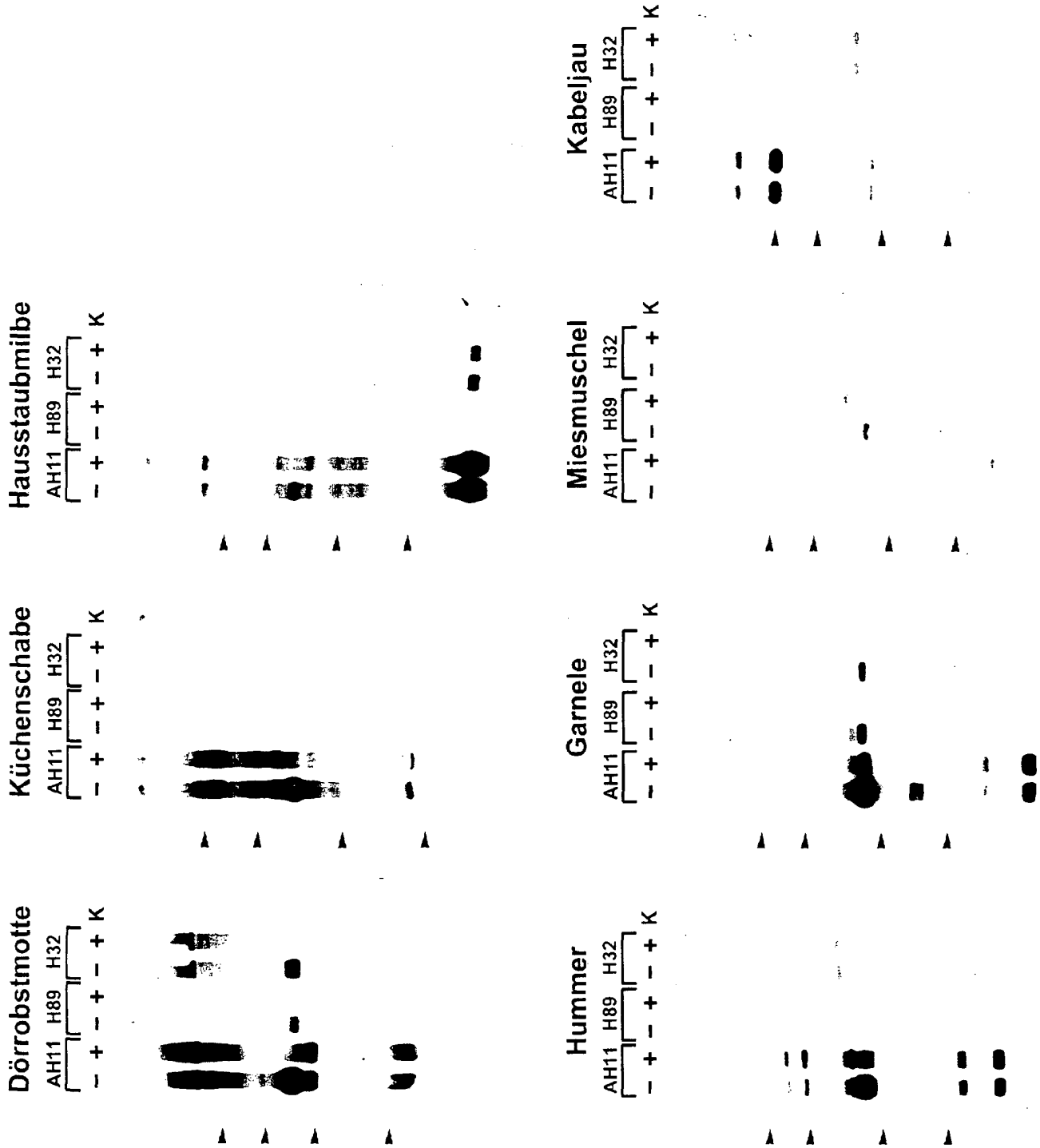


Fig. 10